

Chondrogenesis of Periosteum-derived Progenitor Cells on Hyaluronic Acid Fiber Scaffold (Hyalograft 3D[®])

Hyun Chong Shin, Yong Soo Choi, Sang Min Lim,
Chang Woo Lee¹, and Dong-Il Kim[†]

[†] Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

¹ Good Shepherd Hospital, Yeoksam-Dong, Seoul 135-080, Korea

TEL: +82-32-860-7515, FAX: +82-32-872-4046

Abstract

Periosteum-derived progenitor cells (PDPCs) were isolated and characterized by flow cytometric analysis using fluorescence-activated cell sorter (FACS). The chondrogenesis of PDPCs was performed on hyaluronic acid fibers (Hyalograft[®] 3D) in chondrogenic induction medium. PDPCs showed the chondrogenic potential when cultured on hyaluronic acid fibers. These results showed that the characterized PDPCs were the chondrogenic progenitor cells and Hyalograft[®] 3D served as a useful carrier for PDPCs in transplantation, proliferation, matrix synthesis and differentiation. Therefore, it could be used as a matrix for healing the defected cartilage.

서 론

손상된 연골 재생시 정상적인 연골에서 얻을 수 있는 연골 세포는 제한되어 있어 연골의 손상 부위가 클 경우 더 많은 세포가 필요하다. 최근 자가 연골세포를 골막과 함께 이식을 하고 있으나 골막이 주는 작용 기작은 확실하게 규명되지 않았다. 한편 골막 채취는 복잡한 수술과정을 거치지 않아 다른 조직보다 손쉽게 얻을 수 있으며, 골막유래 연골 전구세포는 passage number와 세포 수여자의 나이에 상관없이 chondrogenic potential을 가지고 있다.¹⁾ 따라서 대체 세포들이 잘 생육 하고, 치료에 이용된 연골세포가 세포외기질을 잘 분비 할 수 있게 하는 환경을 제공 하는 적당한 지지체가 필요하다.

본 연구에서는 골막조직 내에 존재하는 세포 중에서 mesenchymal progenitor surface marker에 양성인 전구세포만을 분리하고, 연골 조직 내 풍부하게 존재하는 hyaluronic acid 성분을 기초로 만든 지지체에서 연골세포로의 분화와 조직형성 가능

성을 확인하였다.

재료 및 방법

골막세포 분리 및 배양

사람의 골막유래 세포는 수술한지 24시간 이내에 확보한 골막조직으로부터 분리하였다. 골막조직을 70% 알코올에 30초 동안 넣었다가 phosphate buffered saline(PBS)으로 수회 세척을 하고 작은 절편으로 자른 후 다시 PBS로 세척을 하여 cambium 층이 배양 dish 쪽을 향하게 놓고 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 넣어 주었다. 5% CO₂, 37°C 상태로 약 7일간 배양하면 배양 dish로 골막세포가 분리되어 증식한다.

Characterization of periosteum-derived cells

골막조직으로부터 분리된 세포를 수확한다. PBS로 세척 후 1×10^6 cells/mL 세포에 형광이 붙어있는 1 mg의 mouse anti-human monoclonal antibody(CD9-FITC, CD45-FITC, CD90-Cy, CD166-PE 또는 모두 FITC가 붙어있는 항체)를 처리하고 얼음에 넣어 20분간 incubation 하고 PBS로 washing한 후 FACSCalibur™ /CELLQuest software(Becton Dickinson)를 이용하여 분석을 하였다. 세포 분리는 sorting 기능이 있는 FACS Vantage (Becton Dickinson)를 사용하였고 CD45⁻ 세포를 분리한 후 three-color 형광 염색을 하여 CD9⁺, CD90⁺, CD166⁺ 세포만을 다시 분리하였다.²⁾

Hyalograft 3D and chondrogenesis

Hyaluronic acid fiber scaffold (Hyalograft 3D) (Fidia Advanced Biopolymers, Italy)를 1×1 cm 조각으로 자른 후 (fiber가 쉽게 풀리지 않도록 화염 처리된 도구 이용) Fetal Bovine Serum(FBS)로 약 1시간 처리해 준 후 준비된 PDPCs를 $1 \sim 2 \times 10^7$ 개 세포를 골고루 접종하였다.³⁾ Chondrogenesis 유도배지는 기본 배지(hMSC Differentiation BulletKit®, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA)에 supplements(hMSC Chondrogenic BulletKit®, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA) 그리고 TGF-β3를 넣어준 것을 사용하였다.

RT-PCR

Hyalograft® 3D에서 배양한 세포를 TRIzol reagent(Invitrogen, USA)를 처리하여 RNA를 추출하였다. RNA PCR kit(Takara Bio Inc.)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Polymerase chain reaction(PCR)은 총 25 mL로 2 mL의 cDNA 주형을 넣고 1 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 0.2 mM의 upstream 그리고 downstream primer, Taq polymerase(Takara Bio Inc.)를 이용하여 수행하였다. 증폭된 PCR products는 1.8% agarose gel에서 TAE buffer를 사용하여 전기영동 하였다.

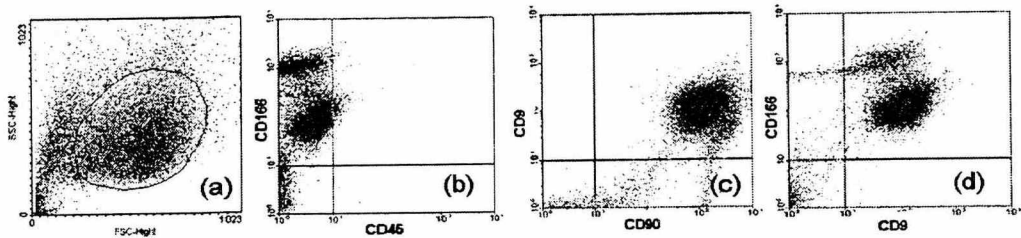


Fig. 19. FACS analysis of PDPCs. FSC/SSC used the same gate for all experiments (a). The double-staining experiments were shown for CD45-FITC/ CD166-PE (b) and triple staining experiments were shown for CD9-FITC/ CD90-Cy/CD166-PE (c,d).

결과 및 고찰

Isolation and characterization of PDPCs

배양액을 조심스럽게 넣은 후 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에 넣고 배양하였다. 배양 7-10일 후에 골막조직으로부터 세포가 떨어져 나와 배양 접시에 붙어 fibroblast의 형태로 증식하는 세포를 얻을 수 있었다. 조직으로부터 분리된 세포의 형태를 현미경으로 관찰하였으며 비교적 균일하였다. 분리된 세포에서 전구세포만을 분리하기 위하여 FACS를 사용하여 양성 marker로 CD9, CD90, CD166, 음성 marker로 CD45를 사용하여 동시에 만족하는 세포만을 분리하였다(Fig. 1). 줄기세포 분리를 위한 단일 maker가 현재까지 알려지지 않았기에 그 확률을 높이고자 줄기세포의 표면에 많이 나타난다고 알려진 항원에 대한 marker를 동시에 만족하는 세포를 선별함으로써 선별되는 전구세포의 확률을 높이고자 하였다. 이렇게 분리된 세포를 골막 유래 전구세포(perioosteum-derived progenitor cells, PDPCs)라 명명하였고, 이 세포들을 계속적으로 계대배양을 하면서 세포의 형태 변화를 관찰한 결과 fibroblast 형태를 유

지하였으며 P15까지 커다란 변화를 보이지 않았다.

Culture of PDPCs on Hyalograft® 3D

1~2 × 10⁷개 세포를 지지체 위에 골고루 접종하고 3시간동안 배양기에 놓아둔 후 지지체의 반대쪽 면에 같은 양의 세포를 접종하였다. 다시 3시간 동안 배양기에 놓아둔 후 chondrogenic induction 배지를 넣어 배양하였다. Fig. 2는 PDPCs를 접종한 후 지지체에서 자라고 있는 모습을 전자현미경으로 확인한 사진이다. 지지체의 수직 단면을 통해 PDPCs가 fiber의 안쪽 공간까지 증식되고 있음을 확인할 수 있었다.

Chondrogenesis

Figure 3은 hyaluronic acid fibers에서 2주간 chondrogenesis 후 mRNA를 추출하여 연골세포 특이적인 type II collagen mRNA가 발현되고 있음을 확인한 결과이다. 기존의 실험을 통해 PDPCs는 pellet 배양을 통해 분리된 PDPCs가 연골세포로의 분화됨을 검증한 바 있으며, 본 연구에서는 hyaluronic acid fiber에서도 그 가능성을 확인하였다.

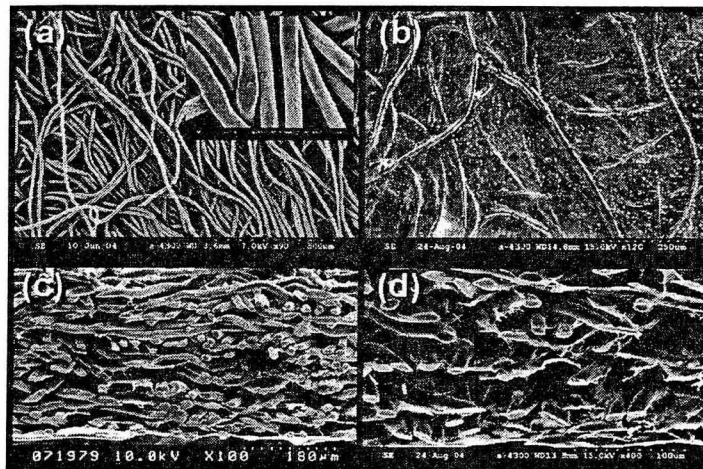


Fig. 2. Scanning electron microscopic observation of PDPCs cultured on hyaluronic acid fibers. Cell-free hyaluronic acid fibers (a, c), PDPCs cultured on hyaluronic acid fibers after 3 days.

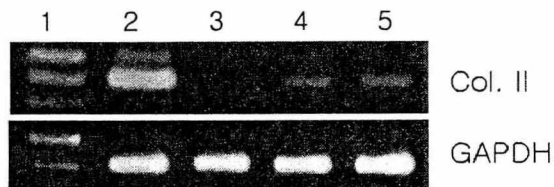


Fig. 3. RT-PCR for chondrogenesis of PDPCs. Lane 1, 1 kb DNA ladder; lane 2, chondrocyte (P0); lane 3, PDPCs (P0); lane 4 and 5, chondrogenesis of PDPCs cultured on hyaluronic acid fibers (P10) for 1, and 2 weeks.

요 약

본 실험에서는 골막조직 내에 존재하는 PDPCs를 분리하고, 기존 피부 이식을 위해 사용되는 Hyalrograft® 3D에서의 chondrogenesis가 가능함을 확인하였다. 수적인 확보가 제한되는 연골세포의 대체 세포로서 PDPCs의 가능성을 확인하였으며 동시에 Hyalrograft® 3D에서의 연골화는 지지체의 양적 확보에 있어 기존의 Hyalrograft® C 보다 경제적이 될 수 있음을 의미한다.

참고문헌

1. De Bari, C., F. Dell'Accio, and F. P. Luyten, "Human preiosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age" (2001), *Arthritis Rheum.* 44, 85-95.
2. Fickert, S., J. Fiedler, and R. E. Brenner, "Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence activated cell sorting" (2003), *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 790-800.
3. Stark, H. J., M. J. Willhauck, N. Mirancea, K. Boehnke, I. Nord, D. Breitkreutz, A. Pavesio, P. Boukamp, and N. E. Fusenig, "Authentic fibroblast matrix in dermal equivalents normalises epidermal histogenesis and dermoepidermal junction in organotypic co-culture" (2003), *Eur. J. Cell. Biol.*, 83, 98-106.