

BMP - 교원질 섬유막 복합체에 의한 이소성 골형성

신홍인* · 서조영**

*경북대학교 치과대학 구강병리학교실, 치주과학교실

**경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환을 비롯하여 여러 원인에 의해 악골의 일부가 상실되고 자생적 회복을 이룰 수 없는 경우 이식골과 다양한 골대용 생체재료가 응용되고 있으나, 이들은 양호한 생체 적합성 및 골전도성에도 불구하고 골유도능의 결여에 의해 만족할 골성회복을 얻지 못하는 경우가 있다. 이에 이소성 골유도능을 지닌 것으로 알려진 골형성인자(Bone Morphogenetic Protein : BMP)의 임상적 응용에 많은 관심이 집중되고 있다¹⁾.

1971년 Uris²⁾에 의해 BMP로 명명된 골형성인자는 생체 내에서 미분화간엽계세포에 작용하여 연골내 골화과정을 유도하는 물질로써, 등전점이 5.0+/-0.2이며, 분자량이 18-30K 정도인 Asp와 Glu가 풍부한 비교원성 산성당단백질로 규정된다. BMP는 70°C이상의 열에 의해 불활성화 되며, 아세트, 순수알콜, 메탄올, 크로르포름 등에 용해되나, collagenase, chondroitinase, alkaline & acid phosphatase등에는 저항적인 것으로 알려져 있다³⁾.

1980년 BMP가 4M Guanidine HCl에 의해

골조직으로부터 추출 가능하다는 사실이 Takaoka 등⁴⁾에 의해 보고되면서 BMP를 정제하기 위한 다각적인 시도가 이루어져, 다양한 정제분리법에 의해 골기질⁵⁾외에 상아질⁶⁾, 골육종 조직⁷⁾으로부터 BMP의 추출이 가능하게 되었다. 정제된 BMP는 생화학적 특성에 의해 Osteogenin⁸⁾, Osteogenic protein(OP)⁹⁾, Osteoinducing factor(OIF)¹⁰⁾ 등으로 명명되었으나, 1988년 Wozney등¹¹⁾에 의해 BMP의 유전자 구조가 밝혀지게 되면서 다양하게 불리던 골형성인자는 BMP로 단일화되어 불리고 있다. 현재까지 BMP-1에서 BMP-9까지 9종류의 BMP가 밝혀져 있으며, BMP-1을 제외한 이들 BMP는 아미노산의 배열에 있어 TGF-beta와 30-40%의 상동성을 보이며, 7개의 cysteine잔기를 지니는 동량량체를 이루고 있어 TGF-superfamily의 일원으로 분류된다.¹²⁾

BMP의 유전자는 종에 따라 염색체내 위치적 차이를 보이고 있으며, 사람의 경우 BMP-1은 8번 염색체, BMP-2, 7은 20번 염색체, BMP-3는 4번 염색체, BMP-4는 14번 염색체, BMP-5, 6은 염색체 6번에 위치하고 있다.¹³⁾ 이들 BMP 유전자는 전사된 mRNA의

* 본 논문은 1995년도 경북대학교 연구비의 보조로 이루어짐

염기 배열에 대응하여, 리보솜에 의해 N말단측에 소수성 아미노산이 나열된 signal peptide, pro region, 그리고 C말단측의 mature region으로 구성된 BMP 단백질을 형성하게 되며, 이는 Golgi체를 경유하면서 이황화결합에 의해 이량체가 되고 당쇄가 결합된 후 세포외로 배출되는 동안 C말단이 절단되면서 활성형이 되어 그 기능을 발휘하게 된다.¹⁴⁾

BMP의 주된 기능으로 잘 알려진 이소성골 형성 과정은 기시기, 촉진기, 유지기로 구분되며, 이는 미분화간엽계세포의 화학주성적 이동 및 증식, 조연골세포로의 분화, 연골세포의 비대화, 혈관의 침습, 연골기질의 석회화, 골형성 및 골개조, 조혈골수를 지닌 소골형성 단계로 진행된다. BMP는 주로 이소성 골형성과정의 기시기에 작용하는 것으로 여겨지고 있다.¹⁵⁾ BMP는 골기질이외에 태생기의 뇌, 간장, 심장, 폐, 위, 소장, 신장, 정소, 난소, 표피 등에서도 관찰된다는 사실에서 BMP의 기능은 골형성유도 외에 중배엽조직의 형성 및 발생 초기의 체축결정에 관여할 것이라는 가능성이 시사되고 있다.¹⁶⁾

BMP에 의한 이소성 골형성능은 clone화된 BMP의 cDNA를 토대로 합성된 재조합BMP보다 골 조직으로부터 직접 추출한 정제 BMP가 보다 양호한 것으로 알려져 있으며, 이는 정제 BMP내에는 다양한 BMP와 규명되지 않은 여러 성분들이 상승적 효과를 나타내기 때문으로 이해되고 있다.¹⁷⁾ BMP에 의한 이소성 골 형성 단계의 세포 및 생화학적 동태는 잘 알려져 있으나 골형성기전에 대한 분자생물학적 이해는 부족한 실정이다.

골로부터 순수 BMP를 얻기 위해서는 번거로운 생화학적 처리와 다량의 골조직이 요구된다. 이는 BMP가 주로 피질골내에 교원질과 견고히 결합되어 있으며, 골 1kg당 1ug 정도로, 다른 골 유래 성장인자인 TGF-beta (460ug/kg), IGF-I(85ug/kg), IGF-II (1260ug/kg) 등에 비해 극미량으로 존재하기

때문이다.¹³⁾ 따라서 유전자 공학적 방법으로 순수 BMP의 대량생산을 꾀하고 있으나, 아직 여러 어려움에 의해 현실화되지 못하고 있다.

고도로 정제된 BMP 및 순수 재조합 BMP는 체내에서 쉽게 확산되어 소실됨에 따라, BMP가 표적세포에 적절히 작용할 수 있도록 BMP를 서서히 그리고 지속적으로 방출시킬 수 있는 매개체가 요구된다. 이를 지지체라 하며, 이들 지지체는 BMP와 결합성이 양호하고, 생체친화성이 양호해야 함은 물론 증식 분화된 세포들에 대한 비계역할을 담당할 수 있어야 한다. 지지체는 골 형성이 이루어지면서 흡수되어 소실되거나 골과 일체화를 이룰 수 있는 것이 이상적이다.¹⁸⁾

BMP의 임상화를 이루기 위해서는 무엇보다도 BMP의 명확한 본태규명, 생물학적으로 안정된 BMP의 양산화 및 이들의 생체내 활성을 극대화할 수 있는 지지체의 개발이 절실히 요구된다. 이에 본 연구는 BMP에 의한 골형성과정에 있어 지지체로서의 교원질 섬유막의 유용성을 평가하고 이소성 골형성과정의 일단을 보다 구체적으로 이해함으로써 BMP의 임상적 적용을 위한 기초 자료를 제공하고자, 부분 정제된 BMP를 교원질 섬유막과 결합시켜 이소성 골 형성을 유도한 후 그 일련의 과정을 조직학적으로 관찰한 바 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1) 실험동물

일정 기간 동일 조건에서 사육한 Sprague-Dawley계 웅성 백서 24마리를 실험군과 대조군으로 12마리씩 배정하고, 이를 다시 3마리씩 1, 2, 3, 및 10주 관찰군으로 나누어 실험에 이용하였다.

2) BMP의 분리 정제

골단부 및 골막, 골수 등 연조직을 제거하여

액체 질소로 동결한 소의 경골을 분쇄기로 400-500um 크기로 분쇄한 후, 1M NaCl/0.05M Tris-HCl 세정액(pH 7.4)으로 충분히 세정하여, 크로르포름과 메타놀을 동량 섞은 용액으로 지방성분을 제거한 후, 세정액으로 재세정하였다. 세정된 골분을 희석한 염산(pH 2.0)으로 4°C에서 24시간 탈회하였다. 이를 단백질 분해 효소 억제제가 함유된 4M Guanidine HCl/50mM Tris-HCl(pH 7.4)용액으로 저온에서 24시간 3회 추출하였다. 추출된 상층액을 미세여과기(UHP150, MW cut off 8,000 Advantec)로 농축한 후 원심 분리(15,000 rpm, 15min)하여 침전물을 제거하고 3um 여과지로 여과하였다. 여과된 용액을 Kuboki등¹⁹⁾의 방법에 준하여 Hydroxyapatite column(ϕ 8.3×12.0cm, Apatite International Inc., Tokyo), Heparin-Sepharose CL-6B column(ϕ 2.6×40cm, Pharmacia LKB), Sephacryl S-300 gel filtration column(ϕ 2.2×141cm Pharmacia, LKB)을 이용하여 230nm에서 감지된 BMP분획(Effluent volume 310-390ml)을 분리, 채취한 다음, 농축한 후 0.1% trifluoroacetic acid로 치환하여 부분 정제 BMP로 사용하였다.

3) 지지체 준비

지지체로는 소의 피부를 구성하는 I형 교원질을 화학 처리하여 형성한 교원질 섬유막을 이용하였다(그림 1). 그 제작 과정을 간단히 기술하면 다음과 같다. Pepsin으로 처리 후 고도로 정제한 후 단백질 농도가 0.3%되게 0.1M acetic acid에 용해한 소 피부의 I형 교원질 용액을 0.15M NaCl(pH7.4)용액으로 일차 투석한 다음, 교원질 용액을 동일 용액으로 농도가 0.05% 되게 희석하고, 0.02M Na₂HPO₄ 용액으로 4°C에서 재투석하였다. 이를 10% hexamethylene diiodothicyanate/ethanol 용액으로 교차 결합시켜 압축한 후, 멸균 소독하여 4°C에 보관하였다.

4) 부분 정제 BMP와 섬유성 교원질막 지지체의 결합

10×5×1mm 크기로 조정된 교원질막을 소독된 유리 접시에 놓고 부분 정제된 BMP 0.3mg이 함유된 0.1% trifluoroacetic acid-용액 0.05ml를 가하여 스며들게 한 후 동결건조하여, 실험 동물에 이식하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

5) BMP-교원질 섬유막 복합체의 외과적 이식

Pentobarbital(30mg/kg)을 복강 주사하여 실험 동물을 마취시킨 후, 배부를 면도날로 삭모하고, 알코올 및 포타딘 용액으로 소독한 다음, 15번 수술 칼로 1cm 간격으로 0.5cm크기의 절개부를 좌우 2군데씩 형성하고, curette을 이용하여 조심스럽게 피하낭을 형성하였다. 형성된 총 4개의 피하낭에 미리 조성하여 -20°C에 보관해 둔 BMP-교원질 섬유막 복합체에 1M PBS용액 0.04ml를 첨가한 후 한개씩 이식하고, 3-0 black silk로 단순 봉합하였다. 대조군 역시 동일한 방법으로 4개의 피하낭을 형성한 후 1M PBS용액 0.04ml를 첨가한 교원질 섬유막 지지체만을 매식하고, 3-0 black silk로 단순 봉합하였다.

6) 표본 제작

각 실험 동물을 술 후 1, 2, 3 및 10주째 도살하여 이식부 조직을 절취하여 10% 중성 포르말린 용액으로 24시간 고정 후, formic acid로 3-7일간 탈회하고, 통법에 따라 계열알콜로 탈수한 다음, 파라핀에 포매하여 4-6um두께의 박편을 제작하고, H&E 이중 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 성 적

1) 대조군 :

이식된 교원질 섬유막은 실험 전기간에 결

쳐 특기할 이물반응 및 흡수상 없이 섬유성 결체조직에 의해 피개되어 잔존되었으며, 주위로의 골 유도 현상은 관찰되지 않았다(그림 2).

2) 실험군 :

이식 1주째 교원질 섬유막은 모세혈관이 다수 분포된 결체조직에 의해 피개되었으며, 다수의 섬유아세포들이 교원질 섬유막내로 유입, 증식되었고, 교원질 섬유막 주위로 소수의 염증세포 및 탐식세포들의 침윤이 관찰되었다. 부위에 따라 섬유아세포양 세포가 조연골세포로 분화되는 양상을 보였으나, 연골기질의 형성은 미약하였다(그림 3). 이식 2주째 교원질 섬유막 주위의 결체조직내에는 보다 많은 혈관들이 분포되었으며, 연골형성이 보다 명확하였다. 연골조직의 형성은 주로 교원질 섬유막 내부에서 이루어졌으며, 혈관의 분포가 보다 현저한 피개막에 면한 부위의 교원질 섬유막 주위에서는 조골세포에 의해 직접적인 골 형성이 이루어지는 양상을 나타내었다(그림 4). 교원질 섬유막 표면을 따라 배열된 조골세포들이 형성 분비한 골양조직이 선상으로 관찰되고, 골 형성이 보다 진행된 부위에서는 섬유골 형태로 골양조직내에 골세포들이 매몰되어 분포되었다. 그러나 이들 조직은 일반적인 신생골주와 달리 소와의 크기가 다소 크고 헤마톡실린에 염색되는 기질의 양상이 연골조직과 유사하였다. 그리고 부위에 따라 교원질막의 석회화가 현저히 진행되었고, 혈관의 유입성장이 진행되면서 차츰 골로 치환되었다. 골형성 유도과정이 보다 진행된 부위에서는 막상 구조를 따라 신생골판을 형성하였으며, 주위로 골수세포들이 미약하게 분포되었다. 이식 후 3주째 골형성 유도과정은 보다 진행되어 교원질 섬유막 사이사이로 신생골의 형성이 보다 현저하였으며, 신생골과 신생골 사이사이에는 혈관이 풍부하고 골수세포들이 조밀하게 분포된 조혈성 골수조직이 분포되었다(그림 5). 또

한 심부에 형성된 연골조직은 석회화되어 다핵거대세포들에 의해 일부 흡수되었으나, 연골조직 상방으로 배열된 조골세포들이 골량을 형성 분비함에 따라 골조직에 의해 매몰되는 양상을 나타내었다. 이식 10주째 교원질 섬유막은 다발을 따라 잘 형성된 골조직에 의해 교원질 다발이 완전히 골량조직에 의해 매몰되어 층판상의 골주를 이루었다. 골판과 골판 사이에는 조혈성 골수가 조밀하게 분포되었으며, 유도 형성된 골조직의 흡수상은 명확하지 않았다(그림 6).

IV. 고 찰

골형성과 발육은 유전적 요소와 국소적 요인에 의해서 조절되는 세포분화과정에 의존하여 개체 형성기, 성장기 및 골절치유시 일어나며, 이는 연골형성을 매개로 하여 골성치환을 이루는 내연골성 골화과정 또는 미분화 세포의 직접적인 조골세포로의 분화에 의한 막성 골화과정에 의해 이루어진다.²⁰⁾ 반면 인위적으로 BMP를 활성화시켜 골형성을 유도하는 이소성 골형성 과정에서는 BMP가 미분화 간엽계세포를 먼저 조연골세포로 분화시킨 후 조골세포의 분화를 유도하는 것으로 특징 지워졌으나, 최근 BMP의 활성을 극대화시키기 위한 수단으로 이용되는 지지체의 성상 및 물리화학적 특성에 따라 그 성격이 달라질 수 있음이 보고되고 있다.²¹⁾ Urist등²²⁾은 혈관주위세포가 BMP의 주 표적세포가 된다고 밝힌바 있으나, 일반적으로 BMP는 이식부의 미분화 간엽계세포에 작용하여 골형성세포로의 분화를 유도하는 것으로 설명되고 있다.²³⁾ BMP가 반응세포들에 작용하기 위해 필요한 시간은 약 5시간이 최적이나, 최소 1시간이 요구되며, BMP에 반응된 섬유아세포양 미분화세포의 조연골세포로의 분화는 5일 이내에 이루어지는 것으로 되어 있다.²²⁾ BMP의 생리활성은 BMP의 순도 및 종류에 따라 차이가 있으며,

골형성유도능을 나타내는에는 최소 50ng으로 가능하다.²⁴⁾ BMP에 의한 이소성 골형성은 용량 의존적으로 국소부에 많은 양의 BMP가 작용할 수록 보다 신속하고 현저한 골형성을 이루게 되며, BMP의 중간 특이성은 없는 것으로 간주되고 있다.²⁵⁾

BMP는 자생적인 골재생이 불가능한 경우에 있어 골대용 생체재료와 달리 골유도능을 지닌다는 사실에서 임상화에 성공할 경우 골이식을 대신할 이식체로써 새로운 장을 열어 줄 것으로 기대되고 있다. 현재 임상화를 목표로 실험적으로 검토되고 있는 BMP는 골에서 직접 추출 정제한 정제BMP와 유전자 공학적 기법을 이용하여 BMP의 cDNA를 토대로 인공적으로 합성한 재조합 BMP로 대별된다.²⁶⁾ 정제 BMP는 생리활성이 강하고 확실한 신생골 유도능을 지니고 있으나 순수한 BMP를 얻기 위해서는 번거로운 생화학적 조작이 필요하며, 재조합 BMP에 비해 작용이 밝혀지지 않은 다수의 다른 요소들이 함유되어 있어 항원성, 감염성 등 안정성에 대한 고려가 이루어져야 하며, 순수한 재조합 BMP는 공급량이 제한적이란 문제를 해결해야 한다. 재조합 BMP에 비해 천연 정제 BMP의 생리활성도가 높은 것으로 알려져 있으며, 이는 정제 BMP 내에는 여러 유형의 BMP 및 규명되지 않은 다른 물질들이 상호 작용하여 상승적 효과를 나타내기 때문으로 이해되고 있다.¹⁷⁾

본 실험에 이용된 BMP는 소뼈를 염산으로 탈회하고 4M Guanidine HCl로 추출한 후 3단 계의 chromatographic column을 거쳐 정제된 것으로서 1kg의 골분말로부터 12mg의 부분정제 BMP를 얻을 수 있었으며, 이내에는 다수의 BMP-3와 소량의 BMP-2, 4등이 미확인 성분들과 혼재되어 있는 것으로 분석되었다. 교원질 섬유막과 결합되어 이식된 BMP의 양은 0.3mg이었으며, 이식 후 면역적 반응의 소견이 되는 특이점을 보이지 않았다는 사실과 섬유성교원막과 양호한 결합성을 보이며 신속한

골형성세포들의 분화를 유도하였다는 사실에서, 본 실험에 이용된 BMP는 중간 특이성 없이, 생리활성이 양호함을 확인할 수 있었다.

BMP의 생리활성을 보다 극대화시키기 위해서는 적절한 지지체와의 복합이 요구된다. 지지체는 생체적합성이 양호해야 함은 물론 결합된 BMP에 의해 미분화 간엽계세포가 골형성세포로 분화 증식을 유도할 수 있도록 BMP를 서서히 지속적으로 방출해야 하며, 분화 증식된 세포들에 대한 비계 역할을 담당할 수 있어야 한다. 또한 쉽게 제작 구입할 수 있어야 하며, 가공 및 성형이 용이해야 한다.¹⁸⁾ 현재까지 검토되고 있는 지지체로는 불용성 골기질(insoluble bone matrix)²⁷⁾, 펩신 처리 교원질²⁸⁾, hydroxyapatite²⁹⁾, tricalcium phosphate³⁰⁾, 타이타늄³¹⁾ 등의 금속입자, polyanhydride중합체³²⁾, 유산 중합체³³⁾, 에틸렌글리코중합체³⁴⁾, 섬유소³⁵⁾, 스쿠알렌³⁶⁾ 등의 단독 또는 복합적 용을 들 수 있다.

본 실험에서 지지체로 이용된 교원질 섬유막은 소 피부에서 추출한 I형 교원질을 가교 결합시켜 제작한 강화 교원질 섬유막으로 항원성을 없애기 위해 교원질 분자 양단의 telopeptide tpsin으로 처리하여 제거하였다. 이의 형태학적 구조는 판상의 섬유막과 이들을 연결하는 가는 섬유로 구성되었다(Fig 1). 교원질 섬유막은 특기할 이물반응을 나타내지 않았으며, 단독으로 이식된 경우 이식 후 10주까지 특별한 흡수상 없이 잔존되었고 BMP와 복합되어 이식된 경우에는 새로 형성된 골기질내에 매몰되어 지속적으로 존재하였다. 이는 골원성 I형 교원성 기질이 이식 후 4주 이후에 현저히 흡수되어 소실된다²⁸⁾는 경우와 달리 형태를 어느 정도 유지하며 지속되는 양상이었다. 이는 골원성의 I형 교원질과 피부 유래의 I형 교원질의 구조적 차이에 기인된 것으로 사료된다. BMP/교원섬유막 복합체에 의한 이소성 골형성 과정은 내연골성 골형성 과정뿐 아니라 직접적인 막성 골형성 과정이 동시

에 관찰되었다. 이는 교원성 섬유막의 물리적 특성에 의한 것으로서, 혈관의 유입이 어려운 심부에서는 화학주성적으로 이동 증식된 세포들이 BMP의 작용에 의해 골형성세포로 분화하는 과정에서 산소분합의 저하로 조연골세포로 분화되고, 혈관의 분포가 보다 많은 표층부 주위에는 조골세포로의 분화가 이루어져 각각의 골형성 양상이 동시에 이루어진 것으로 해석할 수 있다. 이와 같은 해석은 Basset³⁷⁾에 의해 알려진 미분화 간엽세포가 저산소분압하에서는 연골세포로, 고산소분압하에서는 조골세포로 분화된다는 사실에서 뒷받침될 수 있다. 다른 한 해석으로는 지지체로 이용된 교원질 섬유막이 골화과정을 이루는 과정에 석회화의 소견을 보인다는 사실에서 석회화된 교원질 섬유막이 석회화 연골기질의 역할을 담당하여 이후 유입되는 혈관을 따라 이동된 조골세포들에 의해 골성대치를 이루는 과정이 연골의 매개없이 직접적인 골형성을 이루어 막성 골화과정으로 간주되는 현상으로 표현되는 것이 아닌가 하는 견해이다. 그러나 조연골세포가 조골세포의 활성화에 앞서 출현한다는 점에서 BMP는 조연골세포로의 분화를 먼저 유도하고 이후에 연골조직으로부터 어떤 조절작용을 받아 조골세포로의 분화가 이루어진다는 설명을 완전히 부정할 수 없다. 또한 심부에 위치한 연골은 혈관의 유입에 따른 전조골세포의 이동이 지연된 반면 표층에 일시적으로 형성된 연골조직이 보다 신속하게 골성치환을 보여 직접적인 골형성에 의한 결과로 오인될 수 있다는 점 역시 배제할 수 없다. 이는 교원성 섬유막을 따라 형성된 일부 골이 탈회표본에서 연골의 형태학적 특성을 함유한 골로 관찰되기 때문이다.

지지체로서의 교원질 섬유막은 세포접착성이 우수하며, 성형이 용이하여 BMP에 의한 골형성을 임의적으로 조절할 수 있을 것으로 사료된다. 즉 BMP와 결합되어 이식된 교원질 섬유막의 형태에 준하여 골이 형성된다는 사

실에서 골결손부의 크기 및 형태에 준하여 BMP 복합체를 형성하여 이식함으로써, 보다 양호한 심미성 및 기능성을 유지하는 효과적인 골성회복을 꾀할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 BMP/교원성 섬유막 복합체는 기계적 강도가 결여되어 있어 입체적인 구조를 유지하는데 다소 어려운 점이 있다. 이는 고품의 생체재료로써 생체적합성이 우수한 다공성의 hydroxyapatite 등을 병용함으로써 보완할 수 있을 것이다. 따라서 교원질 섬유막은 치주질환 등에 의해 국소적인 파괴가 이루어진 경우와 임프란트를 위한 지지골의 보충이 요구되는 경우에 적절히 재단하여 생체친화성이 강한 고품 생체재료와 혼합하여 이용함으로써 원하는 강도 및 형태의 골 형성을 유도하는 것이 가능할 것이란 점에서 장래 임상에 있어 자가골 이식을 대신할 것으로 기대되는 BMP의 유용한 지지체로서의 높은 가능성을 시사한다 할 수 있다.

V. 요약

BMP에 의한 이소성 골형성과정에 있어 지지체로서의 막성 I형 교원질의 유용성을 평가하고 이소성 골형성과정의 일단을 보다 구체적으로 이해함으로써 BMP의 임상적 적용을 위한 기초자료를 제공하고자 소뼈로부터 부분 정제된 BMP를 교원질 섬유막과 결합시켜 백서의 피하에 이식하여 이소성 골형성을 유도한 후 그 일련의 과정을 1, 2, 3 및 10주에 걸쳐 조직학적으로 관찰한 바 다음과 같은 소견을 얻었다.

1. 단독으로 이식된 교원질 섬유막은 특기할 이물반응 반응 없이 이식 후 10주까지 잔존되었으며, 주위로의 이소성 골형성은 유도되지 않았다.
2. BMP/교원질 섬유막은 양호한 이소성 골형성을 나타내었고, 이식 1주째에 내연골

성 골화과정에 의한 골성 유도가 시작되어 이식 2주째부터는 이식체 심부에서는 내연골성골화 과정이 외측면에서는 막성 골화과정이 각각 관찰되었다.

3. 이소성 골형성은 이식 후 10주에 걸쳐 지속적으로 이루어져 조혈성 골수를 지닌 양호한 골형성을 이루었으며, 특기할 흡수상이나 변성상을 보이지 않았다. 그리고 신생골에 매몰된 교원성 섬유막은 신생골과 일체화되어 지속적으로 유지되었다.

이상의 소견상 BMP에 의한 미분화세포의 골형성세포로의 분화는 지지체의 물리화학적 특성 및 국소환경에 따라 조연골세포 및 조골세포로 독립적 경로로 이루어져, 이소성 골화 과정은 내연골성 골화과정, 막성 골화과정, 그리고 이들의 복합적 양상으로 표현되는 것으로 사료되며, 항원성을 제거한 교원질 섬유막은 적합한 BMP의 지지체로 시사되었다.

참고문헌

1. Lindholm, T.C., Lindholm, T.S., Marttinene, A., and Urist, M.R.: Bovine bone morphogenetic protein(bBMP /NCP) - induced repair of skull trephine defects in pigs, Clin., Orthop., 301 : 263 - 270, 1994
2. Urist, M.R. and Strates, B. S.: Bone morphogenetic protein, J. Dent. Res., 50 : 1392 - 1406, 1971.
3. Urist, M. R., Hue, Y.K., Brownell, A.G., et al. : Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 371 - 375, 1984.
4. Takaoka, K., Ono, K., Amitani, K., et al. : Solubilization and concentration of a bone inducing substance from a murine osteosarcoma, Clin. Orthop., 148 : 274 - 280, 1980.
5. Bessho, K., Tagakawa, T., and Murata, M.: Purification of bone morphogenetic protein derived from bovine bone matrix, Biochem. Biophys. Acta., 165 : 595 - 601, 1989.
6. Kawai, T. and Urist, M.R.: Bovine - tooth - derived bone morphogenetic protein, J. Dent. Res., 70 : 171 - 175, 1991.
7. Bauer, F.C.H. and Urist, M.R.: Human osteosarcoma - derived soluble bone morphogenetic protein, Clin Orthop., 154 : 291 - 295, 1989.
8. Sampath, T.K., Muthukumaran, N., and Reddi, A.H.: Isolation of osteogenin an extracellular matrix - associated bone inductive protein by heparin affinity chromatography, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84 : 7109 - 7113, 1987.
9. Sampath, T.K., Coughlin, J.E., Whetstone, R. M., et al.: Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP - 1, and BMP - 2A two members of the transforming growth factor - beta superfamily, J. Biol. Chem., 265 : 13198 - 13205, 1990.
10. Bentze, H.M., Nathan, M., Rosen, D.M., Armstrong, R.M., et al. : Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone, J. Biol. Chem., 264 : 20805 - 20810, 1989.
11. Wozney, J.M.: The bone morphogenetic

- protein family and osteogenesis, *Mol. Reprod. Dev.*, 32 : 160 – 167, 1992.
12. Rosen, V., and Thies, R.S.: The BMP proteins in bone formation and repair, *Trends Genetics*, 8 : 97 – 102, 1992.
 13. Wozney, J.M.: Bone morphogenetic proteins and their gene expression : Cellular and molecular biology of bone (Masaki, Noda ed) Academic press, Inc. pp 131 – 167, 1993.
 14. Shinichiro, O.I.D.A.: Structure and expression of BMP, *J. Dent. Med.*, 38: 355 – 363, 1993.
 15. Reddi, A. H. and Cunningham, N.S.: Bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins, *Biomaterials*, 11 : 33 – 34, 1990.
 16. Suzuki, A. Nishimatsu, S., Murakami, K., et al.: Differential expression of Xenopus BMPs in early embryos and tissues *Zoological Science*, 10 : 175 – 178, 1993.
 17. Sakurai, N.: Purification of bone morphogenetic protein and investigation of its effects on osteoblastic cell line UMR 108, *Oral Stomatol.*, 60 : 169 – 182, 1993.
 18. Aldinger, G., Herr, G., Kusswetter, W., et al. : Bone morphogenetic protein: a review, *Int. Orthop.*, 15 : 169 – 177, 1991.
 19. Lida, S., Kawasaki, T., Mizuno, M., and Kuboki, Y.: Bone formation in osteoporotic rats reduced effect of bone morphogenetic protein(BMP) ascribed to the suppressed osteoblast differentiation, *Jpn. J. Oral Biol.*, 36 : 249 – 262, 1994.
 20. Ting, K., Petropulos, L.A., Iwatsuki, M., Nishimura, I.: Altered cartilage phenotype expressed during intramembranous bone formation, *J. Bone & Mineral Res.*, 8 : 1377 – 1387, 1993
 21. Yubola: Y., Sarto, T., Murata, M., Takita, H, Mizuno, M., et al.: Two distinctive BMP – carriers induce zonal chondrogenesis and membranens ossification, respectively : Geometrical factors of matrices for cell – differentiation, *Connective tissue. Res.* 32 : 219 – 226, 1995.
 22. Scott, C.K. and Hightower, J.A.: The matrix of endochondral bone differs from the matrix of intramembranous bone, *Calcif. Tissue Int.*, 49 : 349 – 354, 1991.
 23. Miyamoto. S. Takaoka, K.: Bone induction in monkeys by bone morphogenetic protein, *J. Bone Joint Surg[Br]* 75 : 107 – 110, 1993.
 24. Worney. J.M.: Bone morphogenetic proteins, *Progress in Growth factor Research*, 1 : 267 – 280. 1989.
 25. Sampath. T.K. and Reddi, A.H. : Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone differentiation, *Cell. Biol.*, 98 : 2192 – 2197, 1984.
 27. Sampath, T.K., and Reddi, A.H.: Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 7599 – 7603, 1981.
 28. Takaoka, K., Koezuka, M., and Nakahara, H.: Telopeptide – depleted bovine skin

- collagen as a carrier for bone morphogenetic protein, *J. Orthop. Res.*, 9 : 902-906, 1991.
29. Kawamura, M., Iwata, H., Sato, K. et al.: Chondroosteogenic response to crude bone matrix proteins bound to hydroxyapatite, *Clin. Orthop.*, 217-292, 1987.
30. Urist, M.R., Lietze, A., and Dawson, E.: Beta tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein, *Clin. Orthop.*, 187 : 277-280, 1984.
31. Kawai, T., Miki, A., Urist, M. R., et al.: Osteoinductive activity of composites of BMP and pure titanium, *Clin. Orthop.*, 294 : 296-305, 1993.
32. Lucas, P.A. : Ectopic induction of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a polyanhydride delivery vehicle, *J. Bio. Mat. Res.*, 24 : 901-911, 1990.
33. Miyamoto, S., Takaoka, K., Okata, T., et al. : Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers of bone morphogenetic protein *Clin. Orthop.*, 278 : 274-285, 1992.
34. Miyamoto, S., Takaoka, K., Okata, T., et al.: Polylactic acid polyethylene glycol block copolymer - a new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein *Clin. Orthop.* 294 : 333-343, 1993.
35. Kawamura, M., and Urist, M.R.: Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein, *Clin. Orthop.* 235 : 302-310, 1988.
36. Kawakami, T., Uji, M., Antoh, M., et al.: Squalane as a possible carrier of bone morphogenetic protein, *Biomaterials*, 14 : 575-577, 1993.
37. Bessett, C.A.L.: Current concepts of bone formation, *J. Bone Joint Surg.*, 44 : 1217-1235, 1962.

Legends

- Fig. 1. Scanning electron microscopic finding of the fibrous collagen membrane($\times 100$).
- Fig. 2. 10 weeks after implantation of FCM alone, the collagen fibers are relatively well preserved without a foreign body reaction(H&E, $\times 200$).
- Fig. 3. 1 week after implantation of BMP/FCM, chondrogenic cells are proliferated within deep portion of fibrous collagen membrane(H&E, $\times 200$).
- Fig. 4. 2 weeks after implantation of BMP/FCM composite, bone formation proceeds in an endochonral and direct bone formation mode(H&E, $\times 200$).
- Fig. 5. 3 weeks after implantation of BMP/FCM composite, direct apposition of osteoid along calcified collagen membrane with bone marrow formation is prominent(H&E, $\times 200$).
- Fig. 6. 10 weeks after implantation of BMP/FCM composite, well formed trabecular bone along with embedded collagen membrane and hematopoietic marrow are noted. There is no evidence of resorptive change of bone(H&E, $\times 200$).

논문사진부도

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Ectopic Bone Formation Induced By BMP – Fibrous Collagen Membrane Composite

Hong – In Shin*, Jo – young Suh**

Dept. of Oral Pathology College of Dentiotug, Kyung – Buk National University

Dept. of periodontology, College of Deutiotug, Kyung –

Buk National University

To investigate the efficiency of a fibrous collagen membrane(FCM) composed of bovine skin type I atelocollagen as a carrier for BMP, partially purified bovine BMP/FCM(0.3mg/10×5×1mm) composites were implanted into the dorsal subcutaneous tissue of rats. FCM alone was also implanted as a control. The implants were harvested at 1, 2, 3, and 10 weeks after implantation, then prepared for routine light microscopic observation.

The FCM alone did not induce osteogenesis and revealed no specific foreign body reaction nor was there any definite resorptive evidence for 10 weeks after implantation, while the BMP/FCM composites induced favorable bone formation in a process that resembled an endochondral and direct ossification mode. At 10 weeks, the well formed bone confined to embedded collagen fibers revealed hematopoietic marrow between bony trabeculae without evidence of resorptive or degenerative changes .

These findings support the suggestion that BMP may induce undifferentiated mesenchymal cells into either chondroblasts or osteoblasts or both independantly according to the chemico – physical characteristics of the carrier, which develops the endochondral and/or direct bone formation process, and suggest that the FCM may be a favorable carrier for BMP.