

사람의 골수 줄기 세포로부터의 골세포 분화 과정에서 BMP-2가 미치는 영향과 그에 따른 분화 유전자의 발현 비교 연구

김인숙²⁾ · 장옥련²⁾ · 조태형²⁾ · 이규백³⁾ · 박용두³⁾ · 노인섭⁴⁾ · F. Weber⁵⁾ · 황순정^{1,2)} · 김명진^{1,2)} · 이종호^{1,2)}

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실¹⁾, 서울대학교 치학연구소²⁾,
고려대학교 의과대학 의공학교실, BK21 의과학사업단, 한국인공장기센터³⁾,
서울산업대학교 화학공학과⁴⁾, 스위스 취리히대학병원 두개악안면외과 뼈연구실⁵⁾

Abstract

THE EFFECT OF RHBMP-2 IN HUMAN BONE MARROW-DERIVED STEM CELLS AS OSTEOGENIC INDUCERS

In-Sook Kim²⁾, Yu-Lian Zhang²⁾, Tae-Hyung Cho²⁾, Kyu-Back Lee³⁾, Yong-Doo Park³⁾

In-Sub Rho⁴⁾, F. Weber⁵⁾, Soon-Jung Hwang^{1,2)}, Myung-Jin Kim^{1,2)}, Jong-Ho Lee^{1,2)}

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University¹⁾,

Dental Research Institute, Seoul National University²⁾, Dept. of Biomedical Engineering,

College of Medicine, Brain Korea 21 Program for Biomedical Science, Korea Artificial Organ Center,

Korea University³⁾, Chemical Engineering Department, Seoul National University of Technology⁴⁾,

Lab. for Osteology, Dept. of Craniomaxillofacial Surgery, University Hospital Zurich, Switzerland⁵⁾

It is commonly acknowledged that bone morphogenic protein (BMP-2) functions as a potential osteogenic inducer in bone formation. Recently, several papers reported that bone marrow-derived stem cell (BMSC) from human is not responsive to BMP-2 in comparison to high capacity of BMP-2 in the osteoinduction of stromal cell derived from bone marrow of rodent animals such as rat or mouse. In this study, we characterized BMSC derived from 11 years old donor for the responsiveness to rhBMP-2, dexamethasone (Dex) and 1,25-dihydroxyvitamin D (vitamin D), in order to analyze their function in the early osteogenesis. The effect of over mentioned agents was evaluated by means of assessing alkaline phosphatase (ALP) activity/staining, RT-PCR analysis and von Kossa staining. In addition, we analyzed the meaning of expressed several osteoblastic markers such as alkaline phosphatase, collagen type I, osteopontin, bone sialoprotein and osteocalcin with relation to either differentiation or mineralization. Only in the presence of Dex, human BMSC could commit osteoblastic differentiation and matrix mineralization, and either BMP-2 or vitamin D treatment was not able to induce. But BMP-2 or Vitamin D showed potential synergy effect with Dex. ALP and bone sialoprotein were clearly expressed in response of Dex treatment compared to weak expression of osteopontin in early osteogenesis. Therefore, we expect that this study will contribute partly to elucidating early osteogenesis mechanism in human, but variations among bone marrow donors must be considered through further study.

Key words : BMP-2, Bone marrow-derived stem cell(BMSC), Dexamethasone(Dex), Osteogenesis, ALP(Alkaline phosphatase)

※ 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구사업 (과제번호: R01-2003-000-11592-0)의 지원으로 수행되었음.

I. 서론

골수로부터 추출한 줄기 세포는 다양한 조건하에서 여러 종류의 세포들로 분화할 수 있는 잠재적인 능력을 보유하고 있다. 이 특성은 세포의 분화에 관한 기초적인 분자생물학적인 연구를 위시하여, 현재 세계 도처에서 연구되고 있는 줄기 세포를 이용한 조직의 재생에 관한 연구에서도 많이 응용되고 있다. 지금까지는 rat이나 mouse를 통한 동물 세포를 이용하여 그 특성을 연구하였으나, 사람의 골수로부터 줄기세포의 분리 방법이 어렵지 않게 이루어짐으로써, 줄기 세포를 이용한 다양한 연구는 앞으로도 상당히 발전될 것으로 기대된다.

지금까지 사람의 골화 과정에 관한 연구는 주로 골 중앙 세포주나, 뼈 조각으로부터 collagenase 처리를 통하여 분리 배양한 조골세포를 이용하였다. Saos-2와 MG63 같은 골 중앙 세포주는 암세포로서의 특징으로 정상적인 골세포 분화과정 연구에 있어서 적절한 model이 되기 어려운 점이 있고, 사람의 원시 골세포 (human primary osteoblast)는 배양은 용이하나, 성장이 느리고 빨리 멈춰버리는 특성으로 연구에 어려운 점이 있다¹⁾. 그러나 직접 골수로부터 분리 배양한 줄기세포는 배지상태에서 많은 수로 증식시킬 수 있는 큰 장점을 갖는다. 물론 계대배양이 증가됨에 따라 증식율이 감소하며, 이에 비례하여 분화능력 또한 감소되는 면이 있으나, 쉽게 osteoblast로 분화되므로 초기 분화 과정 연구에 아주 유용한 모델로 쓰이고 있다²⁾. 최근에는 골수 줄기세포를 불멸화시킨 세포주 형태로 전환시켜 이를 통한 연구도 활발하다³⁾.

골수로부터 분리한 줄기세포의 분화 다양성은 배아 줄기 세포 만큼은 크진 않으나, 지금까지의 연구에서 각각의 특정 조건 배양을 통하여 골세포(osteoblast), 연골세포(chondrocyte), 지방세포(adipocyte) 그리고 근육모세포(myoblast)와 신경세포(nerve cell)로도 분화가 가능성이 입증되고있다⁴⁻⁶⁾. 골세포로의 분화에서, 유도 물질로는 glucocorticoid의 합성물인 dexamethasone(Dex)이 가장 널리 쓰이고 있으며⁷⁾, 쉽게 골세포로 분화를 유도하지만, Dex는 rat에서 골세포 분화 유도 기능을 일으키나, mouse에서는 그렇지 않다고 보고되어^{8,9)}, 이는 종간의 특이성이 있는 것으로 보인다. 탁월한 효과를 나타내는 골 형성 유도 물질인 bone morphogenetic protein(BMP-2)에 대해서는, rat와 mouse에서는 줄기 세포에서 조골세포로의 분화를 유도한다고 결과가 보고되었으며^{10,11)}, 또한 지방전세포(preadipocyte)나¹²⁾ 섬유아세포(fibroblast)¹³⁾, 근육세포(myoblast)¹⁴⁾ 등의 세포로 분화된 경우에서도 조골세포로의 역분화를 유도 할 수 있을 만큼, 조골세포로의 분화에서는 큰 의미를 갖는 물질임이 입증되었다. 그러나 사람의 골수 줄기세포에 있어서는 골세포로의 분화를 유도한다는 보

고와¹⁵⁾ 더불어 크게 영향을 미치지 못한다는 서로 상반되는 결과가 보고되어^{16,17)}, 본 연구에서는 사람의 골수로부터 분화되는 초기 골세포 분화 과정에서 BMP-2의 역할과 이를 통한 골 형성 특이 유전자들의 의미를 규명하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 골수 줄기 세포 분리와 배양

Vilamitjana-Amedee 등의 논문에서 기술한 바와 같이 골수 기증자의 장골부위로부터 골수를 추출한^{18,19)} 골수 세포는 Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 농도에 따라 분리된 층으로부터 분리한 뒤, DMEM에 10% FBS를 함유한 플레이트에 3-4 × 10⁴ cells/cm²의 밀도로 세포를 간다. 3-4 일에 한번씩 배지를 갈아주면서 군집(colony)을 형성되어 플레이트에 60-70% 정도 찰 때까지 기른 다음 계대배양을 시작한다. 골세포 분화유도를 위해서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) [JBI, Korea]배지에 10% FBS [Gibco, BRL]와 ascorbic acid(50μg/ml)[Sigma], β-glycerophosphate(10mM)[Sigma]를 첨가한다. Dexamethasone (10nM)[Sigma], BMP-2 (100ng/ml) [R&D systems], Vitamin D (10nM)[Sigma]의 농도에 분화 유도 배지에서 3-4 일에 한번씩 각각의 유도물질을 첨가한 배지로 바꿔주면서 배양한다.

2. 세포 증식 측정

분리 배양한 줄기세포를 96well plate에 1,500cell/200 μl/well의 수로 플레이트에 이식한 후 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 첨가 후 37℃, 5% CO² incubator에서 배양한다. 1 일째 측정은 20시간 후 tetrazolium salt (WST-8)의 일종인 CCK-8(Cell Conting Kit-8, DOJINDO, Japan) 용액을 10μl씩 각각 세포가 들어있는 96well에 넣어준 다음, 37도에서 방치한다. 4시간 후 450nm에서 흡광도를 측정한다. 배지는 3일에 한번씩 갈아주면서 3일째, 7일째에도 같은 방법으로 4시간 전에 CCK-8 용액을 넣어준 후 흡광도를 측정한다.

3. ALP(alkaline phosphatase) 효소의 활성도 측정과 염색

ALP 효소 활성 측정은 ALP assay kit (Sigma Aldrich Diagnostics, USA) 에 따른 방법으로 측정하였으며, 수치는 방출된 인산기 (Pi)의 농도 (nm)/ 30분 반응시간 (min)/ 단백질량 (mg)의 비율로 표시하였다. ALP 염색은

ALP staining kit (Sigma Aldrich Diagnostics, USA)의 방법에 따라 시도하였다.

4. 전체 RNA 분리와 RT-PCR

전체 RNA는 TRIZOL® Reagent (Invitrogen life technologies)를 사용하여 분리하여 -70도에 보관하였다. cDNA 합성은 분리한 RNA 1 µg 을 이용하여, 전체 20 µl 부피에 superscript II reverse transcriptase (RT)와 oligo(dT) 12-18 primer (invitrogen)를 이용하여 합성하였다. 각각의 유전자에 대한 프라이머는 직접 제작하였으며, PCR 반응시 94도에서 2분, denaturation 후 94도에서 40초 denaturation, 60도에서 40초 hybridization (primer 결합), 72도에서 1분 extension (합성) 과정을 30회 진행 후, 72도에서 10분 마지막 합성 과정으로 시도한다.

4. von Kossa staining

세포를 10% formaldehyde 용액으로 고정한 후, 5% silver nitrate 용액을 넣고 30분 동안 반응 시키고 증류수로 씻어준 뒤 sodium-carbonate formaldehyde 용액을 2분간 처리 한다. Staining 용액 (1volume 10% K4Fe(CN)6.3H2O + 9volume 10% sodium thiosulfate)을 넣고 20분 동안 반응을 시킨 후, 증류수로 씻어준 뒤 염색 여부를 관찰한다.

Ⅲ. 연구결과

1. 골수로부터 줄기 세포의 분리 배양

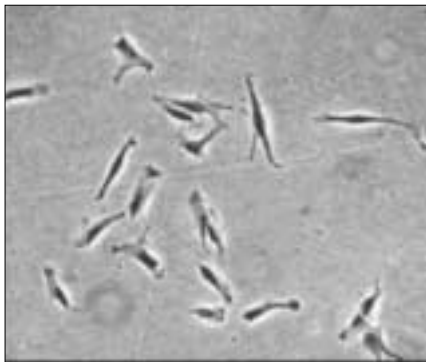
골수로부터 분리 후 8일째부터 바닥에 부착된 세포가 관찰되었으며 그로부터 12일 후부터는 섬유세포(fibroblast)와 유사한 형태의 군체 형성 단위로 군집을 이루면서 번식되는 형태가 관찰되기 시작했다(Fig. 1). 세포가 60-70% 정도 plate를 채울 때까지 기른 다음 그 상태를 계대접종 (passage) 0 (P0)으로 하여, 계대 접종 2(P2)까지 기른 다음 이번 실험을 수행하였다.

2. 세포 증식에 미치는 효과

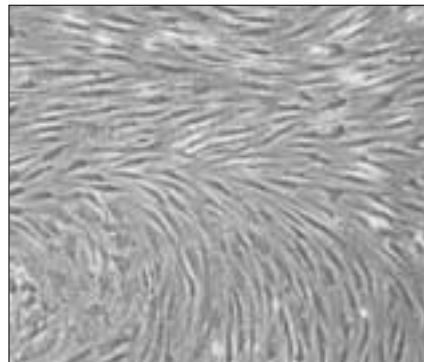
줄기 세포를 Dex (10nM), BMP-2 (100ng/ml), Dex/BMP-2, Vitamin D (10nM) 그리고 Dex/Vitamin D 각각의 조건 배지에서, 1일째, 3일째, 7일째에 성장 정도를 측정하였다. BMP-2는 세포 증식에 별다른 영향을 미치지 못하였으나, Dex(10 nM)이 첨가된 배지에서는 7일째부터 대조군 보다 30% 이상씩 증식이 감소되었다. Vitamin D (10 nM)는 그 자체만으로도 줄기세포의 증식을 지연시키는 효과가 있었다(Fig. 2).

3. Alkaline phosphatase assay

골세포 분화 정도를 나타내는 표시인자인 alkaline phos-



A. 8 days



B. 12 days

Fig. 1. Morphology of cultured human bone marrow-derived stem cell; A. at 8 days and 12 days after plating nucleated cells extracted from bone marrow

phatase 효소의 활성은 7일째 BMP-2와 Vitamin D가 첨가된 배지에서 자란 세포군은 대조군과 같이 전혀 ALP 활성이 나타나지 않음을 보여주고 있다(Fig. 3). Dex만이 또는 BMP-2 내지는 Vitamin D가 Dex 와 같이 첨가된 배지에서만이 활성도가 증가되고 있으며, 특히 BMP-2는 Dex와 같이 처리하였을 때, Dex만 처리했을 때보다 7배 정도의 활성이 증가된 양상을 보여주고 있다. 11일째 시도한 ALP 염색에서, 양성 반응을 보인 세포들은, 기질이 뺏쳐나가는

골세포 특이적 형태로 변화가 일어남이 관찰되었다. 이는 ALP 발현으로 골세포로의 형태학적인 변화가 수반된 것을 보여 준다. 21일째 시도한 염색에서도 초기 단계의 경향과 일치하는 결과를 보여주고 있다(Fig. 5). 이를 통해 줄기세포에서 골세포로의 전환 과정에서 dexamethasone이 다른 유도 물질들보다 우선적으로 작용하며, BMP-2와 Vitamin D는 그 자체만으로는 유도를 일으키지 못하나 dexamethasone과 동시에 처리시에 그 효과가 증대됨을 알 수 있었다.

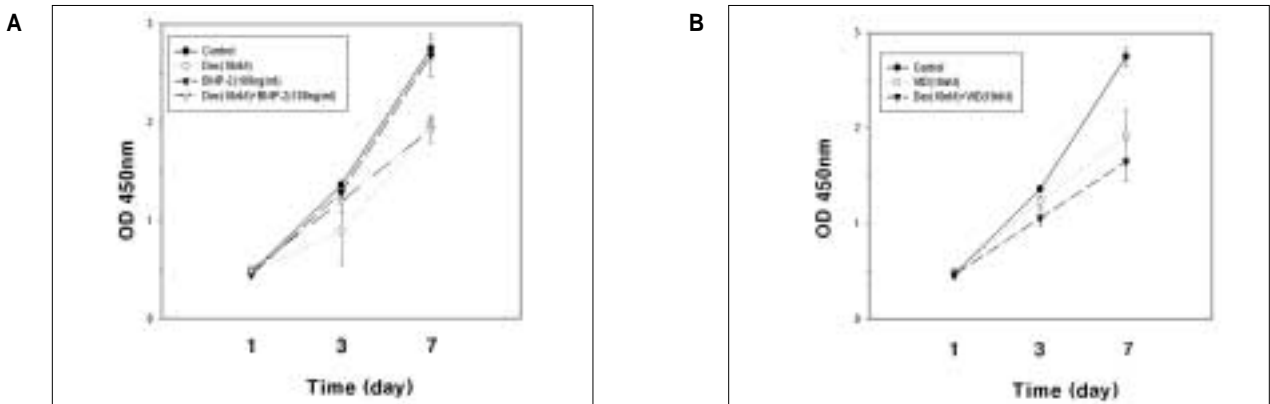


Fig. 2. Proliferative effect at 1 day, 3 days and 7 days after treatment of A: dexamethasone (10nM), BMP-2 (100ng/ml) and Dex/BMP-2, B: Vitamin D (10nM) and Dex/ Vitamin D

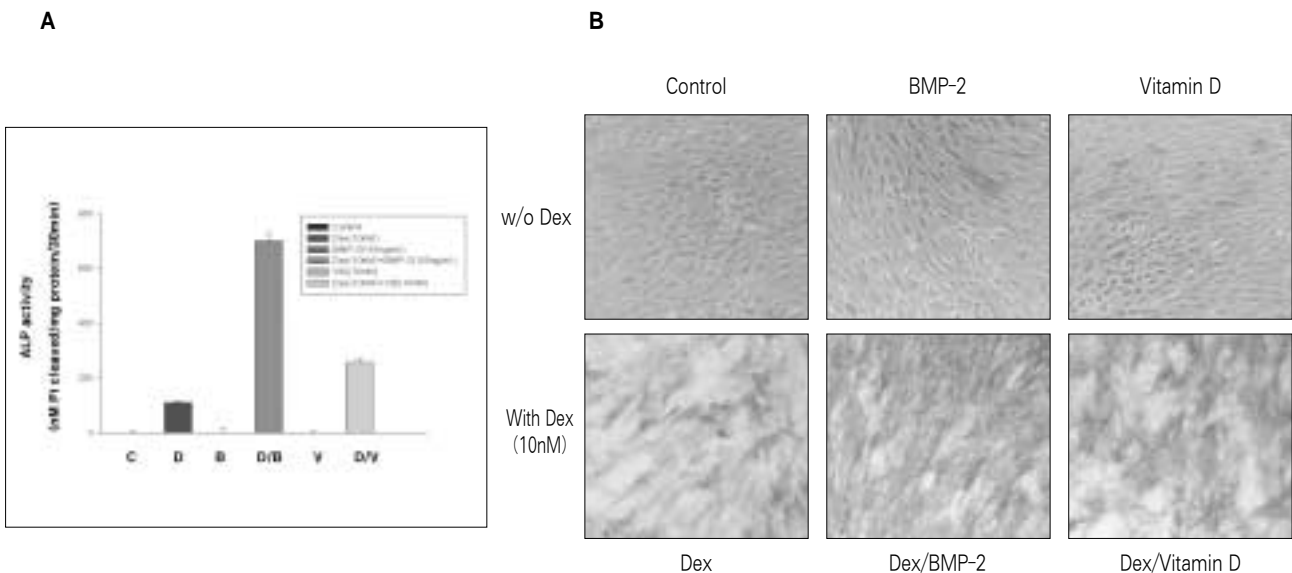


Fig. 3. ALP assay (A) after 7 days and staining (B) at 11 days in osteoblast differentiation medium supplemented with Dex (10nM) (D), BMP-2 (100ng/ml) (B), Vitamin D (10nM) (V), Dex/BMP-2 (D/B) and Dex/Vitamin D (D/V)

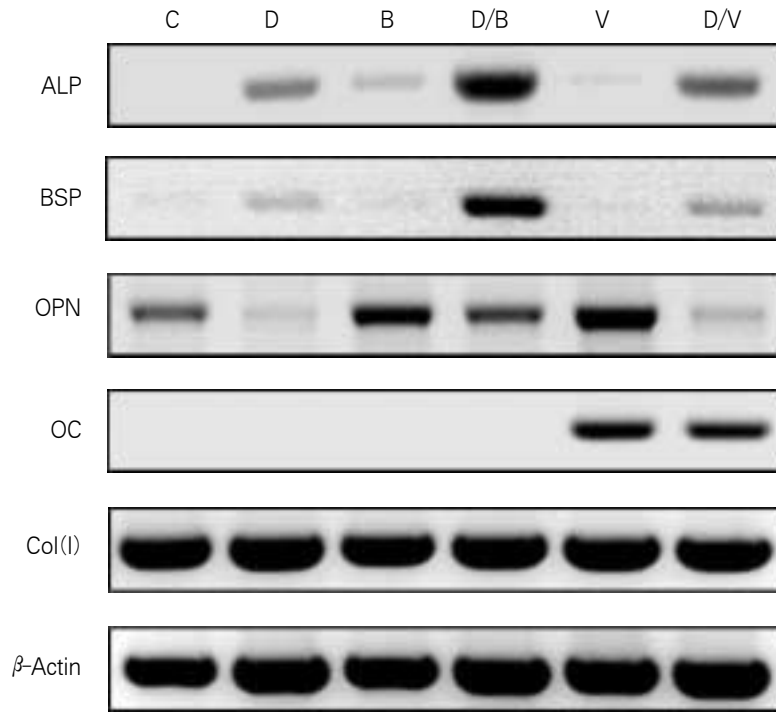


Fig. 4. RT-PCR analysis for expression of several osteoblast markers at 7 days in culture supplemented with D(Dex 10nM), B(BMP-2 100ng/ml), D/B (Dex/BMP-2), V(Vitamin D), D/V(Dex/Vitamin D; ALP (Alkaline phosphatase), BSP (Bone sialoprotein), OPN (osteopontin), OC (osteocalcin), Col(I) (collagen type I) and β -actin as control

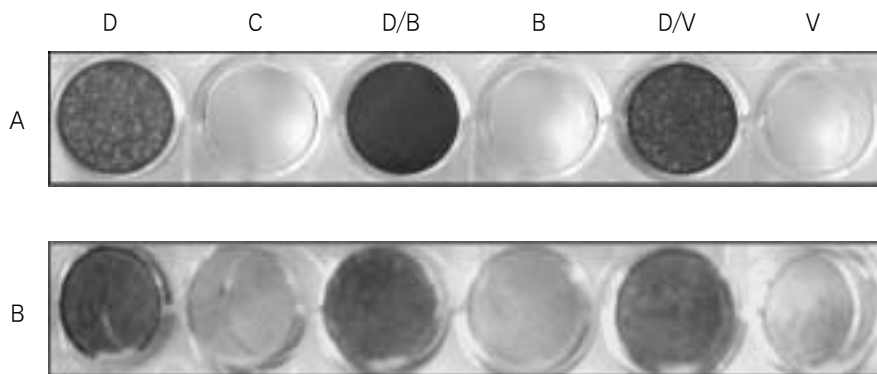


Fig. 5. von Kossa staining(A) and ALP staining(B) at 21 days in differentiation medium supplemented with Dex (10nM), BMP-2 (100ng/ml), Dex/BMP-2, Vitamin D (10nM) and Dex/Vitamin D; C (control), D (Dex), B(BMP-2), D/B (Dex/BMP-2), V (Vitamin D), D/V (Dex/Vitamin D)

4. RT-PCR 분석

초기 골화 과정에서 발현되는 특이 단백질의 발현이 어떻게 이루어지는지를 RT-PCR 을 통해서 관찰하였다(Fig.

4). ALP 유전자의 발현은 Dex를 첨가한 배지에서만이 이루어졌고, Dex와 BMP-2를 같이 처리한 배지에서 가장 높은 발현이 이루어졌으며, BMP-2와 Vitamin D만 각각 처리한 배지에서는 발현이 나타나지 않았다. 이는 ALP 효소

분석 결과와 같은 경향을 보여주었다. 그리고 ALP 보다는 발현 정도는 낮았지만 ALP 발현과 같은 경향으로 Dex를 첨가한 배지에서 발현이 유도된 유전자는 bone sialoprotein이었다. Osteopontin은 BMP-2나 Vitamin D만 처리한 경우 오히려 발현이 증가하였고, Dex에 의해서 감소하였다. 그러나 Dex와 BMP-2를 같이 처리한 배지에 의해서는 발현이 관찰되었다. Osteocalcin은 Dex나 BMP-2에 의해 영향을 받지 않았고, 오직 Vitamin D에 의해서만 발현이 유도되었다. Collagen type I은 대조군을 비롯하여, 유도물질에 영향을 받지 않고 일정하게 발현되는 것이 관찰되었다.

5. von Kossa staining

평판배지 (plate)에서 골기질 광화작용 (matrix mineralization)을 관찰하는 방법으로 von kossa staining 방법이 쓰이고 있으며, 이 방법을 통해 칼슘기(Ca)와 인산기(Phosphate)의 침착 정도를 가늠할 수 있다. 분화 유도 배지에서 21일 동안 각각의 유도물질을 3, 4일에 한번씩 갈아주면서 지속적인 배양을 한 후 염색하였다. ALP 유전자의 발현정도과 같은 경향으로 Dex가 첨가된 조건 배양 (Dex, Dex/BMP-2, Dex/Vitamin D)에서만 강하게 염색되었고, 대조군과 더불어 BMP-2와 Vitamin D 만이 함유된 배지는 전혀 침착이 이루어 지지 않았다. 초기 ALP 활성이 나타난 조건하에서만 미네랄화 과정이 일어난 것으로 보아, RT-PCR을 통한 ALP 유전자의 발현 측정 내지 활성도 측정은 미네랄화를 예측할 수 있는 직접적인 척도로 쓰일 수 있는 것이 명확하게 증명되었다.

IV. 총괄 및 고찰

Dex는 생체내에서 발현되는 glucocorticoid의 화학적으로 합성된 물질의 형태로서, 골수 줄기 세포의 골세포로의 분화에 있어서 가장 확실한 효과를 나타내는 것으로 보여지는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서 같은 결과를 보였다^{20,21)}. 또한 BMP-2에 반응하지 않은 골수 세포는 Vitamin D에 대해서도 반응하지 않았으며, 이들 두 물질은 Dex와 동시에 처리시에 의해서만 그 효과가 나타나고 있다. 즉 Dex에 의해 골형성의 초기 단계가 자극되고 난 후에야, BMP-2와 Vitamin D가 작용하는 것으로 보인다. BMP-2는 rat이나 mouse의 두개골에서 분리한 조골세포나 MC3T3-E1 세포주에서, 강력한 골형성 유도물질이라는 많은 결과들이 있고^{22,23)}, 또한 사람의 골 조직으로부터 분리 배양한 완전 분화된 골세포 (mature osteoblast)에서도 같은 결과들이 보고되고 있다²⁴⁾. 그러나 이들은 공통적으로 이미 골세포로 분화된 성숙한 골세포들로서, BMP-2가 분화된 골세포에 미치

는 영향은 이견이 없는 것으로 보인다. 그러나 초기 분화 단계를 연구함에 있어서, 골수 줄기 세포에서 골세포로의 분화과정 연구에서는 BMP-2의 기능에서는 여러 이견을 보여주고 있다. 즉 동물이나 사람 사이의 이종 간의 차이점 뿐만 아니라, 사람 내에서도 여러 다양성을 나타내고 있다. 즉 개개인이 갖는 차이점, 나이나 성별, 건강 상태, 유전적인 특이성으로 인한 다양성이 나타나고 있다. 10% 미만의 사람에게서 BMP-2가 직접적으로 분화를 유도하며, 나머지 90% 이상은 BMP-2에 의해서 분화가 유도되지 않거나 미미하며, Dex가 첨가된 배지에서 배양되는 경우에만 BMP-2에 반응을 한다는 결과들이 나오고 있다²⁵⁾. 또한 분리 과정에서의 차이점이나 배양 조건이나 사용한 배양액이나 혈청의 종류에 따라서도 조금씩 다른 결과가 나오기도 한다. 골수 줄기세포에서 BMP-2가 초기 골세포 분화에 있어서 미미한 영향을 미치는 것은, BMP-2의 신호전달 체계가 작용하는 것이 아니라, 그 영향이 간접적임에 있다고 보는 견해가 주를 이룬다. 이번 실험에서도 BMP-2에 의해 osteopontin의 발현이 제대로 유도되었으며, BMP-2의 수용기인 BMPR-IA와 BMPR-IB의 발현이 일어난 것을 RT-PCR을 통해 확인할 수 있었다(결과는 제시하지 않았음). 이는 Vitamin D의 경우에 있어서도, osteocalcin의 발현은 유도되었으나, ALP의 발현을 유도하지 못한 것으로 보아, Vitamin D도 BMP-2와 마찬가지로 ALP 발현에 간접적으로 영향을 미친다고 볼 수 있다. 즉, 줄기 세포내에서 BMP-2나 또는 Vitamin D의 신호 전달 과정은 일어나, ALP의 증가를 일으키는 아직 알려지지 않은 중간 센서물질을 유도시키지 못함으로써, 골세포 분화를 일으키지 못하는 결과를 낳았다고 추정된다.

골세포 분화과정에서 1차적인 측정 유전자이고 동시에 골세포 분화의 특이 단백질로 측정되고 있는 물질은 alkaline phosphatase 효소이다. 이 효소는 뼈 조직 외에도 간이나 신장 등 여러 조직에서도 발현이 되고 있다²⁶⁾. 유리 인산기를 형성시켜, 세포 외로 방출시킴으로써 뼈조직 형성에서 중요한 hydroxyl apatite의 침착 형성에 기여를 한다. 이번 실험에서 von Kossa staining과 연관된 결과 분석에서 ALP 효소의 활성도의 증가는 von Kossa staining에서 측정된 골화 정도의 증가와 일치하였으며, 이는 ALP 효소의 활성은 골화 과정의 척도로 사용될 수 있음이 증명되었다. 또한 골 특이 ALP 유전자에 대한 RT-PCR 결과도 von kossa staining과 ALP 효소의 활성도 측정과 염색 정도가 모두 서로 일치하는 결과를 보였다. ALP 유전자의 발현은 Dex가 첨가된 배지에서만 증가되었고, BMP-2와 Vitamin D만이 첨가된 배지에서는 유도되지 못했고, 다른 분화관련 유전자들 중에서 ALP와 bone sialoprotein 만이 Dex에 의해 유도되었다. Bone sialoprotein은 osteocalcin과 함께, 기질이 성숙되면 미네랄화 과정으로 들어가는 단계에 발현

이 되는 단백질임에도 불구하고, 분화 초기 단계에서 Dex, DEX/BMP-2, Dex/Vitamin D를 처리한 배지에서, ALP 발현과 비례하여 발현됨이 관찰되었다. 비콜라겐성의 단백질인 osteopontin은 BMP-2와 Vitamin D에 의해 발현이 유도되었고, osteocalcin은 Vitamin D에 의해 발현이 크게 증가하였지만, ALP 발현이 이루어지지 않으면 뼈의 미네랄화에 크게 기여할 수 없는 것으로 보인다.

Dex는 BMP-2나 Vitamin D와 다르게 ALP 발현을 유도할 수 있는 골세포 분화 특이 인자의 발현을 유도한 것으로 보인다. 설치류 동물의 초기 분화과정에서 중요한 전사인자에는 Cbfa1/RUNX2^{27,28)}, MSX-2²⁹⁾, Dlx-5³⁰⁾ 또는 Osterix³¹⁾가 그 기능을 담당한다고 동물 골세포를 이용한 연구에서는 증명이 되고 있지만, 사람 골세포에서는 아직 명확하게 밝혀지고 있지 않다. 사람에서는 이들의 기능이 약간 변형되어 있거나, 아직 밝혀지지 않은 새로운 인자가 그 기능을 담당할 수도 있다는 가설이 있다²⁵⁾. Dex에 의해 유도되는 ALP나 bone sialoprotein이 어느 유도인자에 의해 조절이 되는지는 아직 알 수 없으나, 사람의 골수줄기 세포주를 이용한 실험에서, Dex에 의해 Cbfa1이 발현에서 전사된 양에서는 대조군과 눈에 띄는 차이점을 찾을 수 없었으나, 단백질이 활성화되는 인산화 과정이 유도됨이 증명되었고³²⁾, Osyczka 등의 보고에서는 rat의 골세포에서 ALP의 발현을 유도하는 것으로 알려진 전사인자 FKHR의 발현이 증가되는 결과가 보고되고 있다²⁵⁾. 이에 대한 증명은 좀 더 다양한 실험이 진행되어야 밝혀질 것으로 보인다.

본 실험에서 사용한 줄기 세포는 각각의 유도 물질에 대한 반응이 명확했으며, 그로 인한 골세포 분화 유전자들의 의미를 구분 지을 수 있었다. 사람의 개인적인 특성이 다양하고, 또는 분리된 골수 줄기 세포의 순도에 따른 차이점이 발생할 수 있으므로, BMP-2나 Vitamin D에 관한 일률적인 반응을 결론 내리기는 어려울 것으로 보인다. 앞으로 다양한 실험을 통하여 좀 더 세밀한 결론을 도출할 수 있을 것이다. ALP의 발현은 초기 골화 과정에서 가장 먼저 이루어지며, 설치류 동물의 골세포와는 달리 bone sialoprotein이 초기 골세포 분화에서 ALP 발현과 더불어 유도되었다. 또한 ALP 효소의 활성 정도에 따라 분화 후기 단계인 미네랄화 정도를 예측할 수 있음이 명확히 증명되었다.

설치류 동물을 이용한 생체 내 실험들과 생체 외 골세포로부터 연구된 결과들이 최종적으로는 인체에 적용될 수 있는 기저로 이용됨에 있어서 사람의 골세포에서 일어나는 골화 과정 연구는 줄기 세포를 이용한 시스템이 가장 적절하다고 볼 수 있다. 동물세포와 사람에게서 일어나는 반응 기작이 서로 다른 점에 관한 연구와 고찰은 앞으로 골형성에 관한 치료나 응용에 있어서 크게 이바지 할 것으로 보인다.

V. 결 론

이 실험에서는 골수로부터 분리한 줄기세포의 조골세포로의 분화에 BMP-2가 미치는 영향을 조사하였다. BMP-2 자체만으로 줄기세포는 조골세포로 분화되지 못했으며, 이에 반해 다른 유도 물질인 dexamethasone에 대해서는 조골세포 특이인자인 ALP유전자의 발현이 유도되었으며 미네랄화 과정도 진행되었다. 자체 분화 유도 능력을 나타내지 못했던 BMP-2와 Vitamin D는 Dex와 같이 처리시 탁월한 상승효과를 얻을 수 있었다. 여러 분화 특이인자 중 ALP의 발현과 골세포의 미네랄화과정은 직접적인 연관관계를 갖고 있었으며, 또 다른 조골세포 특이 인자인 osteopontin이나 osteocalcin은 ALP 효소의 활성도가 뒷받침되지 못할 경우, 초기에 유도 발현되더라도 미네랄화를 촉진시키지 못했다. 본 연구결과는 사람의 골수로부터 분리 배양한 줄기세포 조골세포로의 초기 분화에 관한 기작에 있어서, 개인간의 다양성 고찰에 기여할 수 있으리라 본다.

참고문헌

1. Robey PG, Termine JD : Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 37(5) : 453, 1985.
2. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R : Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 : 1161, 2000.
3. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, et al : Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res* 14(9) : 1522, 1999.
4. Prockop DJ : Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 276(5309) : 71, 1997.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411) : 143, 1999.
6. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, et al : Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113(12) : 1701, 2004.
7. Cheng SL, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al : Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134(1) : 277, 1994.
8. Lian JB, et al : Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology* 138(5) : 2117, 1997.
9. Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME, et al : Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 146(3) : 370, 1991.
10. Balk ML, Bray J, Day C, Epperly M, Greenberger J, et al : Effect of rhBMP-2 on the osteogenic potential of bone

- marrow stromal cells from an osteogenesis imperfecta mouse (oim). *Bone* 21(1) : 7, 1997.
11. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I, et al : Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161(1) : 218, 1994.
 12. Skillington J, Choy L, Derynck R : Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *J Cell Biol* 159(1) : 135, 2002.
 13. Si X, Yang L, Y. Jin : [Effects of human BMP2 gene transfection on NIH3T3 cells in vitro]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 34(2) : 103, 1999.
 14. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, et al : Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20(23) : 8783, 2000.
 15. Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL : Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 67(3) : 386, 1997.
 16. Diefenderfer DL, Osyczka AM, Garino JP, Leboy PS : Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3 : 19, 2003.
 17. Diefenderfer DL, Osyczka AM, Reilly GC, Leboy PS : BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:305, 2003.
 18. Rickard DJ, et al : Isolation and Characterization of Osteoblast Precursor Cells from Human Bone Marrow. *Journal of Bone & Mineral Research* March 11(3) : 312, 1996.
 19. Vilamitjana-Amedee J, Bareille R, Rouais F, Caplan AL, Harmand MF, et al : Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A(9) : 699, 1993.
 20. Peter SJ, Liang CR, Kim DJ, Widmer MS, Mikos AG : Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J Cell Biochem* 71(1) : 55, 1998.
 21. Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV: Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 61(2) : 182, 1996.
 22. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, et al : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 113(3) : 681, 1991.
 23. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, et al : Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127(6 Pt 1) : 1755, 1994.
 24. Hay E, Hott M, Graulet AM, Lomri A, Marie PJ: Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J Cell Biochem* 72(1) : 81, 1999.
 25. Osyczka AM, Diefenderfer DL, Bhargava G, Leboy PS : Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organs* 176(1-3) : 109, 2004.
 26. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, et al : Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143(3) : 420, 1990.
 27. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, et al : A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13(8) : 1025, 1999.
 28. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, et al : Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5) : 765, 1997.
 29. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, et al : Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24(4) : 391, 2000.
 30. Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, et al : Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 11(11) : 1681, 1997.
 31. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, et al : The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1) : 17, 2002.
 32. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S : Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18(2) : 213, 2003.

저자 연락처

우편번호 110-749
 서울특별시 종로구 연건동 28
 서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
이종호

원고 접수일 2004년 7월 20일
 게재 확정일 2004년 11월 13일

Reprint Requests

Jong-Ho Lee
 Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University
 28 Yeongun-Dong, Chongro-Gu, Seoul, 110-749, Korea
 Tel: ++82-2-2072-3061 Fax: ++82-2-766-4948
 E-mail: leejongh@plaza.snu.ac.kr

Paper received 20 July 2004
 Paper accepted 13 November 2004