

원저

## 사람 연골하골 중간엽 줄기세포의 효율적인 골형성 유도

허정은<sup>1</sup> · 조윤제<sup>2</sup> · 유명철<sup>2</sup> · 백용현<sup>1,3</sup> · 이재동<sup>1,3</sup> · 최도영<sup>1,3</sup> · 박동석<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 골관절질환 한방연구센터

<sup>2</sup>경희대학교 의과대학 정형외과학교실

<sup>3</sup>경희대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

## Induction of Effective Osteogenesis by Mesenchymal Stem Cells from the Human Subchondral Bone

Huh Jeong-eun<sup>1</sup>, Cho Yoon-je<sup>2</sup>, Yoo Myung-chul<sup>2</sup>, Baek Yong-hyeon<sup>1,3</sup>,  
Lee Jae-dong<sup>1,3</sup>, Choi Do-young<sup>1,3</sup> and Park Dong-suk<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Oriental Medical Research Center for Bone and Joint disease,

<sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Collegy of Medicine,

<sup>3</sup>Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

*Background* : Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in most of the tissue matrix, taking part in their regeneration when injury or damage occurs. The aim of this study was to investigate the presence of cells with pluripotential characteristics in human subchondral bone and the capacity of these cells to differentiate to osteoblast.

*Methods* : Human subchondral bone were digested with collagenase. Isolated cells were cultured with a-MEM, 15% FBS, 10<sup>-8</sup>M dexamethasone and 50 ng/mL ascoric acid. Cells from 0 day(isolated cells), 7 day (first subculture) and 14 days (third subculture) were used to carry out phenotypic characterization experiments flowcytometry analysis with 11 monoclonal antibodies) and osteogenic differentiation experiments. Osteogenic differentiation of cells was assessment by quantification of bone extracellular matrix components by following analysis: alkaline phosphatase(ALP) stains to detect ALP activity, RT-PCR and western blot to detect osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) and type I collagen(Col I), and Alizarin red stains to detect calcium deposition.

\* 본 연구는 2006년 보건복지부 한방치료기술 연구 개발사업 지원 연구비에 의하여 수행 되었음(B030008).

· 접수 : 2006년 9월 11일 · 수정 : 2006년 9월 14일 · 채택 : 2006년 9월 14일

· 교신저자 : 박동석, 경희대학교 한의과대학 침구학교실

Tel. 02-440-7702 E-mail : dspark49@yahoo.co.kr

**Results** : Flowcytometry analyses showed that in our population more than 98% of cells were positive for MSC markers: SH-2(CD105, 99%), CD29 (95%), CD73 (95%). Cells were negative for hematopoietic markers (CD11b, CD34, and CD45). Furthermore, cells showed positive stain to multipotent markers such as CD117 (c-kit) (15.1%), and CD166 (74.9%), and cell adhesion molecules such as CD54 (78.1%) and CD106 (63.5%). The osteogenic specific marker analyses showed that the culture of these cells for 7 and 14 days stimulates ALP, OCN, OPN and Col I synthesis by RT-PCR and Western blot analysis. Also, after 14 days in the culture of MSCs induces mineralization by Arizarin red stain.

**Conclusion** : In this work, we demonstrated a new and efficient method for osteoblastic differentiation of human subchondral bone stem cells. As MSCs takes part in reparative processes of adult tissues, these cells could play an important role in osteogenesis.

**Key words** : Human subchondral bone; Mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation

## I. 緒 論

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)는 골수, 제대혈, 조직 등에 존재하는 성체줄기세포 중 하나로 미분화상태에서 증식할 수 있는 능력을 가지며, 뼈 세포, 연골세포, 지방세포, 및 근육세포, 심근세포 및 혈관세포로 분화할 수 있는 다중분화능(multipotency)을 가지고 있다. 최근 중간엽 줄기세포가 연골조직, 골형성에 관여하여 세포를 분화유도시킬 수 있다고 보고됨에 따라 자가이식에 의한 세포치료제나 유전자치료의 도구로 사용하고자 하는 노력이 증대되고 있다<sup>1-3)</sup>.

현재 골 손실의 치료에는 자가골 이식과 동종골 이식의 방법이 있는데, 전자의 경우 자가골을 채득함에 있어 공여부위 그 범위가 매우 제한적일 수밖에 없으며, 동시에 채득부위의 손상이 일어나는 단점이 있고, 후자의 경우에는 면역거부 반응의 문제가 있다. 그러나 중간엽 줄기세포의 경우 면역거부 반응의 문제가 거의 없는 것으로 보고되고 있어 세포치료연구에 큰 장점을 갖는다<sup>4-7)</sup>.

현재까지 골재생을 위하여 1차로 시도되었던 방법은 여러 가지 성장인자(bone morphogenic protein, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor)를 직접적으로 골절부위에 주사하여 그 주위의 MSC세포를 유도함으로써 골재생을 유도하였으나 골형성 분화 효율이 떨어지는 단점이 있다고 보고된 바 있다<sup>8)</sup>.

2차로 시도된 방법은 viral vector를 이용한 유전

자 치료로 두개골 결함을 보인 nude-mouse에 유전자 전달시 유효한 치료 효과를 보였고 성장유전자를 근육부위에 주사하여 중간엽 줄기세포의 성장과 분화를 유도시킴으로써 골형성 치료 속도를 증진시킨 연구결과가 있다<sup>9-11)</sup>. 그러나 viral vector로 인하여 암을 유발하는 등 안정성의 문제가 대두되고 있다. 3차로 시도된 것은 중간엽 줄기세포를 이용한 세포치료제 개발로 효과적인 연구결과의 가능성을 제시하고 있으나 여러 가지 단점을 가지고 있다. 첫째, 골수, 제대혈, 및 지방 등에서 얻은 줄기세포에서는 세포 융합으로 중간엽 줄기세포로의 분화 효율이 10% 미만으로 떨어지는 단점을 갖고 있다. 이에 배아줄기세포를 이용한 연구가 이의 단점을 극복할 수 있는 세포로 사용되고 있다. 둘째, 줄기세포 공급에 있어 다양한 조직으로부터 대량의 중간엽 줄기세포의 분리가 가능한지를 연구할 필요가 대두되고 있다<sup>12-14)</sup>.

본 연구에서는 중간엽 줄기세포를 이용한 세포치료에 있어 뼈세포로 분화 유도시 분화효율이 떨어지는 단점의 보완 및 다량의 중간엽 줄기세포를 분리하기 위하여 새로운 조직을 탐색하고자 하였다.

연골하골(subchondral bone)은 골재생에 있어 그 중요성이 강조되고 있다. 한 가지 예로써, 뼈에서 분리한 세포가 골형성을 위한 분화 유도시 feeder cell로서 사용되어 bone chip역할을 함으로써 싸이토카인을 처리하지 않고도 분화를 효율적으로 유도시킨 연구결과가 보고 된 바 있다<sup>15)</sup>. 또한 연골하골은 연골 및 뼈 부위에 가장 근접한 조직으로써 골재생시 직접적, 간접적으로 관여할 것으로 생각된다. 이에 연골하골에서 세포를 분리 후 배양하여 중간엽 줄기

세포의 발현량을 측정하였고, 골형성 정도를 측정하기 위하여 type I collagen(Col I), osteocalcin(OCN), osteopontin(OPN), alkaline phosphatase(ALP) 발현 및 mineralization 정도를 RT-PCR, Western blot, 세포 표면항원 분석 및 염색을 통하여 분석하였다.

## II. 方 法

### 1. 세포분리

인공관절 수술시 무릎관절 부위를 분리하여 수술실에서 받았다. 연골부위는 제거한 후 연골하골을 작게 조각내어 0.2% type II collagenase 20 mL을 넣고 100rpm에서 30분 반응하였다. 세포 부유액을 0.45um의 nylon mesh에 통과시켜 세포를 모았고, 세포분리과정을 3회 반복하였다. Fetal bovine serum(FBS) 최종 농도가 20% 되도록 첨가하여 효소 활성을 억제시키고, 1200rpm, 5분간 원심분리하였다. 세포 침전물에 15% FBS가 포함된 a-MEM 배지 20mL을 넣고 다시 원심분리 하여 세척하였다. 세포수를 counting 후  $1 \times 10^6$ /mL 세포를 T25 cm<sup>2</sup> flask에 넣고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 2. 계대배양

골형성 유도 배양액(a-MEM in 15% FBS, 50µg/ml ascorbic acid, 10<sup>-8</sup>M dexamethason)를 사용하여 7일간 배양 후 90% confluent시 계대배양을 실시하였다. 배양액을 제거한 후 PBS로 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 2mL 넣고 배양기에서 30~60초간 놓아둔다. 반응 후 세포 부유액에 15% FBS가 포함된 a-MEM 배지를 넣고 세포를 수거한 후 원심분리 하여 세포를 세척한 후 유도 배양액으로 배양하였다.

### 3. Flowcytometry(FACS) analysis

세포를 분리한 후 (0day)와 배양 후 7day, 14 day, 21day에 각각 trypsin 처리하여 세포를 수거한 후 세포표면 항원을 분석하였다.

세포가  $1 \times 10^6$ /50µl 되도록 5mL falcon tube에 나누어 분주하였다. Fluorescence isithiocyanate(FITC)

-conjugated anti-CD34 anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD117과 phycoerythrin(PE)-conjugated anti-CD105, anti-CD106, anti-CD54, anti-CD166, anti-CD29, anti-CD73, anti-ALP와 anti-Stro-1을 10µl씩 넣고 잘 섞어준 후 은박지로 덮고 30분간 4°C에서 반응하여 세포를 염색한다. 반응 후 차가운 PBS를 1mL 넣고 1000rpm에서 3min간 원심분리 하여 세척한 후, 부유액은 버리고 0.5mL의 차가운 PBS를 넣은 후 FACS로 분석하였다.

### 4. RT-PCR analysis

0, 7, 14day 동안 배양된 세포에서 RNA를 분리하였다. RNA검출 과정은 세단계로 진행한다. Total RNA preparation -> reverse transcription -> PCR -> gel running -> EtBr staining -> U.V.에서 관찰 및 촬영한다.

#### 1) RNA preparation (Trizol kit 사용)

배양된 세포를 PBS로 세척한 후 Trizol 1mL 넣는다. Chloroform을 200µl 넣고 혼합한 후 10분간 실온에서 반응 후 10,000g에서 15분간 원심분리 후 상층액을 수확한다. 상층액과 동량의 isopropanol을 혼합하고 10,000g에서 10분간 원심분리 한다. 차가운 75% ethanol로 washing 후, 상층액 제거, 공기중에서 건조, RNase-free water (e.g. DEPC)에 용해시키고 -70°C에 보관한다.

#### 2) RT-PCR

##### ① Reverse transcription

total RNA	1~5µg
Oligo dT(15 mer)	1µl
10x reverse transcriptase buffer	2µl
10mM DTT	4µl
10mM dNTP	1µl
Reverse transcriptase(250units/µl)	1µl

DEPC water to 20µl

95°C 5분 : RNA denaturation
42°C 60분: Reverse transcriptase reaction
65°C 5분 : Enzyme killing

② PCR

cDNA	5 $\mu$ l
10x PCR buffer	2 $\mu$ l
Taq DNA polymerase(5units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
5' primer	1 $\mu$ l
3' primer	1 $\mu$ l
water to 20 $\mu$ l	

1단계 : 95 $^{\circ}$ C, 5분, 1cycle  
 2단계 : 30cycle  
     95 $^{\circ}$ C, 30초 : denaturation  
     58 $^{\circ}$ C, 60초 : annealing  
     72 $^{\circ}$ C, 30초 : polymerization  
 3단계 : 72 $^{\circ}$ C, 5분, 1cycle

Sequences of the PCR primers and the expected sizes (bp) of the amplified products

OPN (250 bp) forward : 5'-CGT GAA GCT GGA GAA GGA GA-3' reverse : 5'-CAA GGG CCG CAG CTT ACA CA-3' OCN (294 bp) forward: 5'-ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC-3' reverse: 5'-GCC GTA GAA GCG CCG ATA GGC-3' Col 1 (461 bp) forward: 5'-GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG-3' reverse: 5'-TAA CCA CTG CTC CAC TCT GG-3' GAPDH (287 bp) forward: 5'-CTT TTA ACT CTG GTA AAG TGG-3' reverse: 5'-TTT TGG CTC CCC CCT GCA AAT-3'

3) Gel-running

1.5% agaros gel을 제조한 후 PCR 산물을 6x loading buffer 4 $\mu$ l와 혼합하여 100 V에서 40분간 전기영동 하였다. EtBr로 염색 후 U.V. 촬영하였다.

5. Western blot analysis

배양된 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 lysis buffer(50mM Tris-Hcl(pH7.4), 150mM Nacl, 1% Triton X-100, 0.1%SDS, 1mM EDTA, supplemented, with Protease inhibitors and Phosphatase inhibitors)를 300ul 넣고 scraper로 긁어내어 1.5 mL tube에

옮긴다. 12,000rpm 에 10분간 원심분리 후 부유액을 새 튜브에 옮긴다. Bradford 용액으로 단백질을 정량 후 20  $\mu$ g의 단백질을 4-12% gradient acrylamide gel에서 120V, 90분간 전기영동 하였다. Transfer system을 이용하여 gel에 있는 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮겨 준다. Membrane은 5% Non fat dry milk(탈지분유)에 2시간동안 반응시킨 후 일차 항체를 2시간 또는 overnight동안 반응시킨다. 세척액(TBS에 0.2% Tween20)으로 10분간 4번 washing 한다. Peroxidase-conjugated goat anti -rabbit IgG 이차항체를 실온에서 2시간 동안 반응 후 처리 후 한 다. 세척액으로 4회 세척 후 enhanced chemiluminescence (ECL)용액으로 감광시킨 후 현상하였다.

6. ALP staining

6well plate에서 각각 7days, 14days, 21days 동안 세포를 배양한다. 배양액을 제거하고, PBS로 세척한다. Methanol로 고정한 후 BCIT-NBT 용액을 약 2 ml첨가하여 반응시킨 후 washing 하고 methyl green 용액으로 세포가 덮일 정도로 첨가하여 실온에서 5 분간 반응시켜 핵염색 한다. 멸균수로 세정하고 관찰 후 사진 촬영하였다.

7. Arizarin red staining

6well plate에서 각각 7days, 14days, 21days동안 세포를 배양한다. 배양액을 제거하고, PBS로 세척한다. Methanol로 고정한 후 2% Arizarin red 용액을 약 2ml첨가하여 반응시킨다. 멸균수로 세정하고 관찰 후 사진 촬영하였다.

III. 結 果

1. 세포의 형태관찰

연골하골 세포를 배양 후 3일째에 플라스크에 부착된 세포형태를 촬영 하였다. 또 7일째에 1차 계대 배양 하였고, 14일째 3차 계대배양 후 90% confluent 한 세포의 형태를 관찰 후 촬영 하였다(Fig. 1).

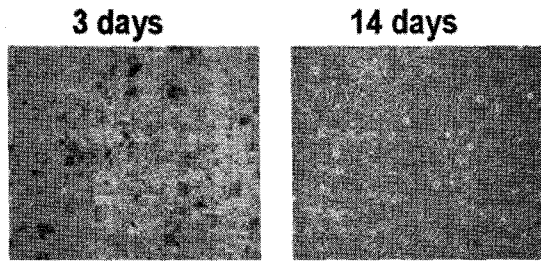


Fig. 1. General morphology of according to the passage of subchondral bone derived MSC cells(100x)

## 2. Subchondral bone에서 분리한 세포의 특성 분석

연골하골에서 분리한 세포의 특성을 분석하기 위하여 flowcytometry를 이용하여 세포표면 항원의 발현을 확인하였다. 이를 위하여 조혈모세포 계통의 표면항원과 MSC 계통의 표면항원을 선택하여 이에 대한 결과를 비교분석하였다.

분석에 활용한 세포 표면항원은 다음과 같다: CD34 (hematopoietic stem cell marker), CD54(ICAM-1), CD45(leukocyte common antigen), CD105(SH-2), CD11b (macrophage), CD106(VCAM-1), CD117(a membrane tyrosin kinase receptor, c-kit), CD166(activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM), CD29 (human integrin beta 1 subunit에 대한 단클론 항체), CD73(lymphocyte differentiation antigen).

연골하골에서 분리한 세포를 분석한 결과, 조혈모세포 표면 항원 및 MSC 표면 항원 모두 대체적으로 음성반응을 나타내었다(Fig. 2, Table 1).

## 3. 다량의 중간엽 줄기세포 분화

분리한 세포를 초기 배양 후 7일째에 중간엽 줄기세포의 발현량을 확인하기 위하여 표면 항원을 염색하여 분석하였다. 실험결과 조혈모세포 표면항원인 CD34, CD45, CD11b은 계속하여 음성반응을 보였고, 7일째에 중간엽 줄기세포의 대표 표면항원인 SH-2의 발현이 98.8%로 증가하였고, 이외에도 CD166, CD29, CD73 항원의 발현이 현저히 증가하였으며, 14일째에는 모두 68%~75%로 증가하였다. 또한 세포의 adhesion molecule인 CD54 및 CD106의 표면항원도 7일째부터 계속 증가 하였다(Fig. 2, Table 1).

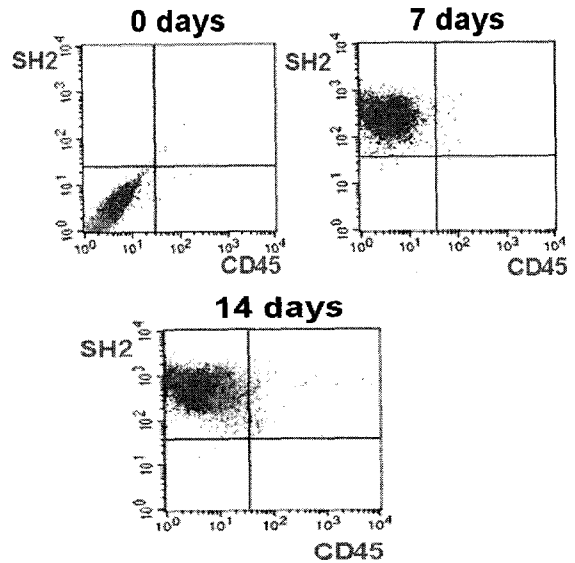


Fig. 2. Flowcytometric analysis of subchondral bone derived MSC cells stained with antibodies SH2 and CD45

Table 1. FACS analysis of subchondral bone derived MSC cells for culture periods

(단위:%)

marker \ days	0	7	10	14
CD105	0.5	98.8	99.1	99.8
CD29	0.2	45.1	60.9	95.0
CD73	0.5	60.1	70.5	95.0
CD34	0.5	1.2	0.9	0.8
CD45	0.1	1.5	1.2	0.2
CD11b	0.3	0.9	0.8	0.7
CD117	0.1	0.2	10.1	15.1
CD166	1.3	37.8	73.8	74.9
CD54	0.3	64	77.5	78.1
CD106	0.7	25.1	53.9	63.5

## 4. 효율적 골형성 유도

배양된 중간엽 줄기세포를 조골세포로 유도하기 위하여 배양하였고, 그 경과를 관찰하였다.

골형성을 위한 분화과정을 확인을 위하여 골 경질화에 필수 성분인 Col I, 세포의 기질 단백질로 골형성에 관여하는 산성 당단백 성분인 OPN, 골의 유기적 구성요소의 하나인 OCN, 조골모세포의 세포막에서 발견되는 단백질인 ALP등의 지표를 정하였다.

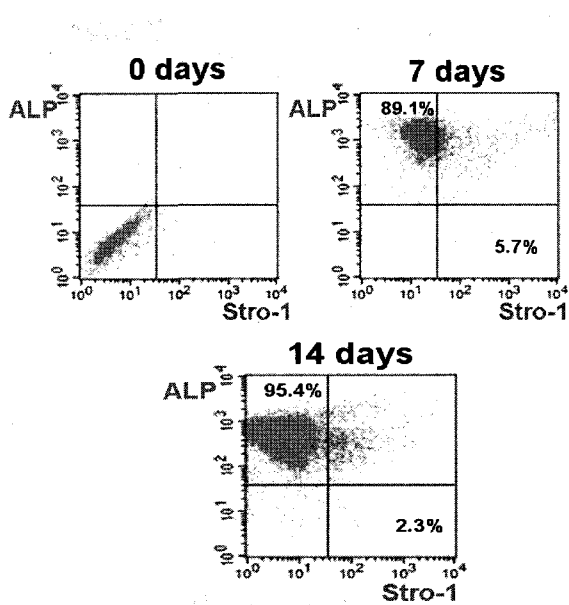


Fig. 3. FACS analysis of alkaline phosphatase (ALP) and stromal cells (Stro-1) in subchondral bone derived MSC cells

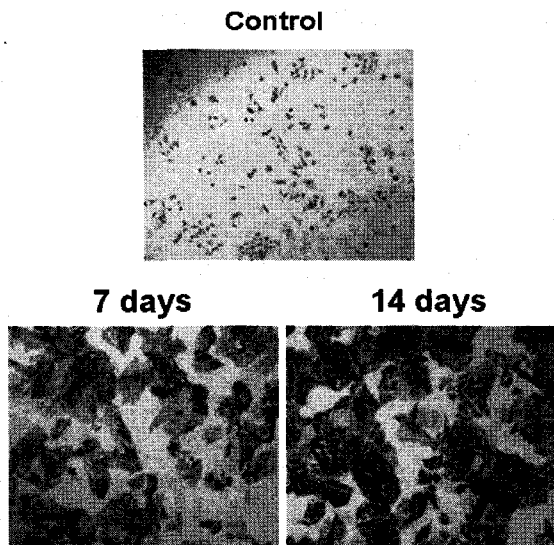


Fig. 4. Immunocytochemistry for alkaline phosphatase in subchondral bone derived MSC cells for 7 days and 14 days (200x)

ALP 발현을 flowcytometry로 분석한 결과 7일째에 이미 약 90%의 양성을 보였으며, 14일에는 95% 이상의 양성세포를 확인 하였고, stromal cell은 음성반응을 보였다(Fig. 3). 또한 ALP 염색을 통하여 ALP 효소 활성이 증가하고 있음을 재확인 하였다(Fig 4).

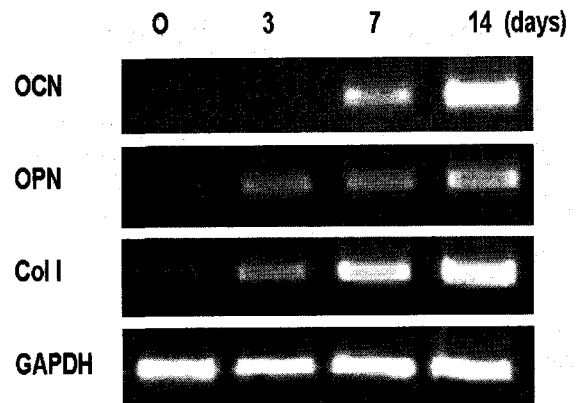


Fig. 5. Expression of osteogenic - specific markers in subchondral derived MSC cells. RT-PCR analyses of osteoblast-specific genes induced after osteogenic differentiation

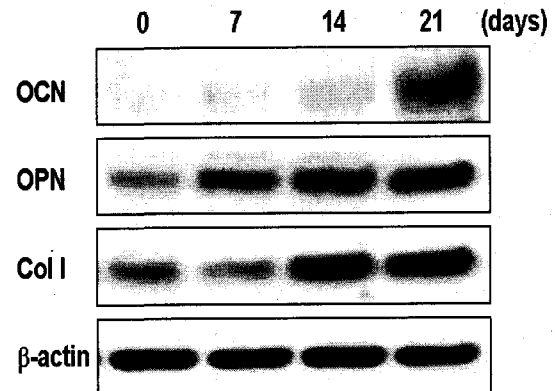


Fig. 6. Expression of osteogenic - specific markers in subchondral derived MSC cells by Western blot analyses

또한 RNA 및 단백질 수준에서 특이적 osteogenic 유전자 발현을 확인하였다. OCN, OPN, Col I의 변화를 분석한 결과, 시간 경과에 따라 3일째, 7일째, 14일째로 점차적으로 증가하였다(Fig. 5). 골형성에 관여하는 유전자들을 Western blot을 실시하여 분석한 결과에서도 모두 증가하고 있음을 확인하였다(Fig. 6).

## 5. Mineralization

뼈는 골강도와 크기를 얻기 위하여 칼슘을 축적하게 되는데, Alizarin Red는 이 칼슘성분과 반응하여 발색하므로 칼슘의 축적 정도를 측정하는데 사용된다.

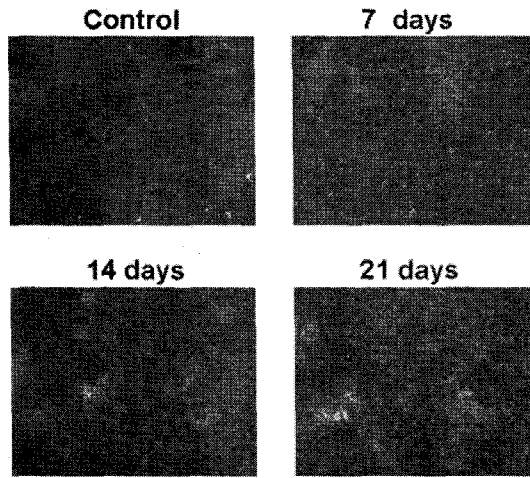


Fig. 7. Alizarin Red stain showing increase of osteogenic calcium deposition (100X)

음성대조군에 비해 7일째에 이미 80%이상의 칼슘 축적이 이루어졌고, 14일째에는 거의 100%인 것으로 나타났다(Fig 7).

#### IV. 考 察

본 연구에서는 중간엽 줄기세포를 다량 확보하고, 단시간에 효율적으로 골형성을 유도시키기 위하여 사람의 연골하골 줄기세포를 분리하여 이용하였다.

Pittenger<sup>1)</sup> 등이 발표한 연구결과에서는 골수의 줄기세포가 MSCs 분화 유도시 14일째에 SH-2가 약 97%(mean fluorescence intensity(MFI) : 500)로 발현되었으나, 본 실험에 사용한 사람의 연골하골 세포로 MSCs 분화 유도시켰을 경우에는 1주일일 단축된 7일째부터 SH-2가 약 98% (MFI: 680)이상으로 발현됨을 확인하였다. 이외에도 CD29, CD73의 MSCs 표면항원이 95%로 강하게 발현되어, 연골하골 줄기세포가 단시간 내에 효율적으로 MSCs로 분화가 유도되었다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2, Table 1).

중간엽 줄기세포의 표면 항원은 계대배양을 하면서 변할 수 있다. 초기에는 내피세포, 상피세포, 근세포의 특징을 보일 수도 있다<sup>15,16)</sup>. 조혈모세포 항원으로 알려져 있는 CD34, CD45, CD11b의 경우 계대를 할수록 그 발현 정도가 점점 낮아지는 것으로 보고되고 있으며<sup>7,17,18)</sup>, 다분화능을 가지고 있어 다양

한 세포로 분화될 가능성을 갖는 항원으로 CD117 (c-kit) 및 CD166(activated leukocyte cell adhesion molecule, ALCAM) 등이 있다. 본 연구에서는 연골하골 줄기세포의 골형성유도시 조혈모세포의 발현은 음성반응을 보였고, CD117과 CD166은 발현량이 증가되는 것을 확인하였다(Table 1). 세포간 접촉인자-1인 CD54(intracellular adhesion molecule;ICAM-1)은 내피세포 표면에서 발현되는 세포간 부착물질의 대표적인 단백질로 혈관내피 세포, 활성화된 백혈구 등에서 발현되며<sup>19)</sup>. 대식세포, 수지상의 세포, 줄기세포를 포함하는 몇몇의 내피계가 아닌 세포형에 의해 발현되는 CD106(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1)은 골형성 유도시 발현이 다량 증가하는 것을 확인하여, 연골하골 중간엽 줄기세포의 골형성 유도에 다분화능 항원과 세포의 부착 물질들이 관여한다는 사실을 확인하였다(Table 1).

비조혈모세포 계통의 기질 세포(stromal cell) 표면항원인 STRO-1은 분화되지 않은 MSC에 존재하다가 골모세포로 분화시 발현되는 항원으로 알려져 있다<sup>20,21,22)</sup>. 본 실험결과, 7일째에 STRO-1이 음성반응을 보였고, ALP 발현이 크게 증가한 결과를 보였다(Fig. 3). 따라서 STRO-1은 골모세포로 분화시 발현된 후 골형성이 이루어진 7일째에 사라지는 것으로 사료된다<sup>23)</sup>.

또한 골형성에 관여하는 유전자들을 확인하기 위하여 Col I, OCN, OPN을 RT-PCR을 통한 transcrit level과 Western blot을 통한 단백질 수준의 분석을 병행하여 측정하였다. 실험 결과 7day부터 골형성이 시작되었고 14day에 거의 골형성이 완료된 것을 확인하였다(Fig. 6, Fig. 7).

최종적으로 Aizarin red 염색을 통하여 칼슘의 침착정도를 확인한 결과, 역시 14 day에 mineralization 이 약 90%가량 이루어진 것을 확인하였다 (Fig. 8).

따라서 본 연구에서 사용한 연골하골 중간엽 줄기세포가 Pittenger 등의 연구결과에서 사용된 골수의 줄기세포에 비하여 다량의 MSCs를 확보하였고, 골형성에 있어 약 1주일 정도를 단축시켰다. 앞으로 연골하골중간엽 줄기세포를 골형성의 세포치료제로 사용하기 위해서는 중간엽줄기세포와 골형성을 구분할 수 있는 새로운 표식인자에 대한 과학적 지표에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다. 또한 임상적 활용을 위하여 기초연구로서 면역학적 거부 반응에 대한 추가적 연구 진행이 필요하다고 사료된다.

## V. 參考文獻

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilinege potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 ; 284 : 143-147.
2. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. Single-colony driven strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997 ; 12(9) : 1335-47.
3. Kuznetsov SA, Riminucci M, Ziran N, Tsutsui TW, Corsi A, Calvi L, Kronenberg HM, Schipani E, Robey PG, Bianco P. The interplay of osteogenesis and hematopoiesis : expression of a constitutively active PTH/ PTHrP receptor in osteogenic cells perturbs the establishment of hematopoiesis in bone and of skeletal stem cells in the bone marrow. *J Cell Biol*. 2004 ; 167(6) : 1113-1122.
4. Maccario R, Podest M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets expressing a regulatory/ suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 ; 90 : 516-525.
5. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Experimental Hematology*. 2005 ; 33 : 928-934.
6. Hua LH, Kemeny DM, Heng BC, Ouyang HW, Melendez AJ, Cao T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *The Journal of Immunology*. 2006 ; 176 : 2864-2871.
7. Niemeyer P, Krause U, Kasten P, Kreuz PC, Henle P, Norbert P, Silkamp AM. Mesenchymal stem cell-based HLA-independent cell therapy for tissue engineering of bone and cartilage. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2006 ; 1 : 21-27.
8. 김성수, 최정원, 광규범, 이영돈, 서해영. 사람 중간엽줄기세포 성장에 미치는 basic fibroblast의 영향. *대한해부학회지*. 2004 ; 37(6) : 509-517.
9. Gafni Y, Pelled G, Zieberman Y, Turgeman G, Apparaily F, Yotvat H, Galun E, Gazit Z, Jorgensen C, Gazit D. Gene therapy platform for bone regeneration using an exogenously regulated, AAV-2 based gene expression system. *Mor Ther*. 2004 ; 9 : 587-595.
10. Kassis I, Zangi L, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF- mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone marrow Transplantation*. 2006 ; 37 : 967-976.
11. Lou J, Xu F, Merkel K, Manske P. Adeno virus mediated human bone morphogenic protein-2 gene transfer induces mesenchymal stem progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Orthop Res*. 1999 ; 17 : 43-50.
12. Kundu AK, Putnam AJ. Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 ; 347(1) : 347-357.
13. Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 ; 24(9) : 2052-2059.
14. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg*. 2006 ; 35(3) : 232-242. Review.
15. Ahn SE, Kim S, Park KH, Moon SH, Lee HJ, Kim GJ, Lee YJ, Park KH, Cha KY, Chung, HM. Primary bone derived cell induce osteogenic differentiation without exogenous factors in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*.



- 2006 ; 2 : 403-408.
16. 임군일. 간엽줄기세포의 조직공학 및 재생의 학에의 유용성. 대한류마티스학회지. 2006 ; 13 : 95-106.
  17. Pelletier JP, Lajeunesse D, Reboul P, Mineau F, Fernandes JC, Sabouret P, Martel-Pelletier J. Dlacerein Reduces the Excess Synthesis of Bone Remodeling Factors by Human Osteoblast Cells from Osteoarthritic Subchondral Bone. *J Rheumatol.* 2001 ; 28 : 814-824.
  18. David B, Burr J. *Rheumatol The Importance of Subchondral Bone in the Progression of Osteoarthritis. Supple.* 2004 ; 70 : 77-80.
  19. 11. *Clin Diagn Lab Immunol.* Decreased Levels of CD54 (ICAM-1)-positive Lymphocytes in the Peripheral Blood in Untreated Patients with Active Juvenile Dermatomyositis. *American Society for Microbiology.* 2000 ; 7 : 693- 697.
  20. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs.* 2002 ; 170 : 73-82.
  21. Gronthos S, Zannettino ACW, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone and Mineral Research.* 1999 ; 1 : 47-56.
  22. Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, Beresford JN. Further Characterization of Cells Expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Mineral Research.* 1999 ; 8 : 1345-1356.
  23. Fang TD, Salim A., Xia W., Nacamuli RP, Guccione S., Song HJM, Carano RA, Filvaroff EH, Bednarski MD, Giaccia AJ, Longaker MT. Angiogenesis is Required for Successful Bone Induction During Distraction Osteogenesis. *J Bone Mineral Research.* 2005 ; 7 : 1114-1124.