

Protein transduction domain을 이용한 recombinant human bone morphogenetic protein-2의 골재생효과

정성원¹, 김남익², 옥종인², 김창성¹, 김형준³, 조규성^{1*}

1. 연세대학교 치주과학교실, 치주조직재생연구소
2. 연세대학교 구강병리학교실, 구강종양연구소
3. 연세대학교 구강악안면외과학교실

I. 서론

Bone morphogenetic proteins(BMPs)는 transforming growth factor - β (TGF- β) superfamily에 속하는 복합기능의 성장인자로서 골과 연골의 형성과 재생을 유도하는 강력한 조절인자이다. BMPs는 피질골의 탈회과정에서 이소성 연골형성과 골형성을 일으키는 유도인자로 발견되었다. Urist는 탈회된 골편을 쥐의 피하조직에 이식한 경우 이식편 주위로 이소성 골 형성이 일어나는 것을 관찰하고 골 내에는 골 형성에 기여하는 특정 단백질이 있다고 하였으며 이를 골 형성 단백질(Bone Morphogenetic proteins ; BMPs)이라고 명명하였다¹. 1988년 Wozney 등이 처음으로 cloning에 성공하면서부터 본격적인 연구가 시작되었다². 그동안의 많은 연구를 통하여 human recombinant Bone Morphogenetic proteins(rh-BMPs)는 TGF- β superfamily로서, 이식되었을 때 신생골 및 신생연골이 생성된다고 알려져 있으며^{2,3} 현재까지 알려진 20종류 이상의 BMP중 BMP -2, -4, -5, -6, -7은 쥐의 이소성 골형성실

험에서 골유도성 물질임이 많은 연구에서 증명되었다^{4,5}. 그 중에서, 포유류 세포(CHO cell)로부터 재조합 DNA기술로 얻어지는 rh-BMP -2, -7는 골유도능이 가장 우수하다고 보고되어, 이를 이용하여 많은 연구가 이루어졌으며, 현재까지 주로 이들이 생산되어 연구재료로 사용되고 있다.

1992년 첫 임상 실험이 진행되었고, 그 안정성이 입증되었다. 2001년에는 rhBMP를 기반으로 하는 임상 제품이 출시가 되었다. 이러한 rhBMP 제품은 특정 carrier를 사용하여 척추골 융합에만 사용이 될 수 있도록 FDA 허가가 나 있다.

하지만 이 방법은 (1) 낮은 농도의 배지에서 BMP의 분리 농축을 위한 대규모의 분리 정제시설과 장비가 필요하고, (2) 분리 정제된 단백질은 수용성이므로 생체조직 내에서 혈액이나 조직삼출물에 의해 쉽게 확산되므로 고등 단계의 종에서는 효과적인 골형성을 위한 BMP의 양은 높아야 한다^{6,7}. 물론, 이러한 제품 개발은 환자로 하여금 자가골 채취라는 부담스러운 수술을 피하게 할 수는 있지만 아직까지 경제적 이득 효과는 크지 않다. 또한 재조합 BMP의

* 교신저자 : 조규성, 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 치주과학교실, 120-752 (전자우편 : kscho@yumc.yonsei.ac.kr)

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2004-000-10353-00) 지원으로 수행되었음

임상적 적용시 초기에 체액이나 혈액을 통해 쉽게 확산되어 국소적인 조직 재생 효과가 떨어진다는 것인데, 이제까지 이러한 문제점을 극복하기 위해 결손부에서 BMP의 송달, 유지, 점진적 유리에 적합한 운반체에 관한 많은 연구가 있었고, 다양한 생체재료가 BMP의 운반체로 개발되고 시험되어져 왔다⁷⁻¹²⁾

최근, 세포막 투과가 어려운 단백질을 효과적으로 세포 내부로 전달할 수 있는 단백질 전달 영역 (Protein transduction domain, PTD)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 펩타이드의 세포막 투과 현상은 빠른 생체 내 반감기로 인하여 약물로 사용하기 어려웠던 치료용 단백질 및 거대분자인 유전자들의 이동을 높여 약물적인 가치를 높일 수 있음을 보여준다. 특정 아미노산 배열로 이루어진 이러한 펩타이드는 자발적으로 세포막을 투과하여 세포 내로 투과하여 들어갈 수 있다는 특성을 가진다^{13,14)}. PTD는 세포 내로 전달이 어려웠던 단백질, DNA, 펩타이드 또는 거대한 화학 물질 등을 효과적으로 세포 내로 전달시키는 기능을 가진 물질전달 펩타이드이다^{15,16)}. 이 중 대표적인 펩타이드는 human immunodeficiency virus(HIV)에서 유래한 transactivator of transcription(TAT)와 Antennapedia (Antp) homeodomain과 HSV VP22 전사인자 등이 있다^{17,18)}. 특히 TAT PTD는 단독으로 또는 다른 단백질에 붙어서도 세포막을 통과할 수 있으며, 10에서 120kDa에 이르는 단백질을 수용체와 상관없이 세포 내로 운반할 수 있음이 보고되었다^{14,19)}. 초기에는 TAT융합단백질이 수용체와 상관없이 세포막 투과를 통해 세포 내로 운반된다고 보고되었으나, 최근에는 TAT융합단백질의 세포 내 유입이 4°C에서 억제되는 것으로 알려짐에 따라 endocytic pathway를 따르는 것으로 보고되었다^{20,21)}. TAT융합단백질이 endocytic pathway를 거치면서 야기되는 문제는 엔도솜에 의해 분해되어 이입된 단백질의 활성이 떨어지는 것이다. 살아있는 세포에서 일어나는 많은 생물학적 과정이 다른 기관의 세포막과 결합하는 과정에서 일어나기 때문에, 엔도솜에 의한 분해는 단

백질 효능연구에 주요 고려사항이다. 이런 문제를 해결하고자 TAT융합단백질의 PTD에 엔도솜을 벗어나는 기능이 입증된 influenza virus hemagglutinin-2의 NH-2 terminal 20 amino acid peptide(HA2) 펩타이드를 삽입하여 이용하려는 노력이 시도되고 있다²²⁾. HA2는 세포막의 sialic acid를 포함한 수용기에 결합하여 엔도솜 안으로 들어오고, 엔도솜을 조절함으로써 단백질의 기능을 활성화시킨다. 실제로 TAT-P53박테리아를 이용한 재조합 단백질 전달 영역을 생산해 낼 경우 다량의 생체 단백질을 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있어, PTD를 이용하여 다양한 단백질을 세포 내로 전달하고 이를 이용하여 새로운 치료법 개발이 시도되고 있고, 특히 HA2와 결합된 HIV-1 TAT융합단백질은 기존의 단백질 치료연구에 보다 효과적으로 적용될 수 있다.

본 연구의 목표는 단백질 전달 영역을 연결한 재조합 BMP2(TATBMP-2)와 추가로 HA2를 결합시킨 재조합 BMP2(TAT-HA2-BMP-2)를 박테리아를 이용하여 생산한 단백질을 사용하여 백서의 두개골 결손부에 이식한 후, 신생골 형성을 조직학적으로 평가해보는 것이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 단백질 전달 영역 함유 재조합 골형성 단백질(TATBMP-2)의 제작

사람의 BMP-2의 cDNA를 RT-PCR을 이용하여 cloning 후 bacterial expression vector에 클로닝하였고 클로닝 된 BMP-2의 5' 부위에 TAT 펩타이드(YGRKKRRQRRR) 염기서열을 삽입하였다. 염기서열 맨 앞에 X-press tag를 연결하였고 분리 정제를 위해 6개의 histidine과 시작 염기서열인 ATG를 삽입하여 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터를 열충격을 이용하여 박테리아 형질 전환을 일으켰다. 형질 전환 박테리아는 대장균 BL21(E-Coli BL21; Invitron Inc)을 사용하였으며 37°C에서 2시간 배양

하고 isopropylthio-galactoside 1mM을 첨가한 후 18시간 추가배양하여 골 형성 단백질 발현을 유도하였다. 원심 분리를 통하여 배양액 내의 대장균을 제거하였고, 8M의 요소 용액을 첨가하여 BMP의 2차 또는 3차 구조를 제거하였다. Ni-Ti bead를 이용하여 얻어진 단백질을 결합하였고 제조사의 지시에 따라 이를 세척한 후 imidazole 용액을 사용하여 용출하여 정제된 단백질(TATBMP-2)을 채취하였다.

2) 단백질 전달 영역 함유 제조업 골형성 단백질 2형(TAT-HA2-BMP-2)의 제작

사람의 BMP-2의 cDNA를 RT-PCR을 이용하여 cloning 후 bacterial expression vector에 클로닝하였고 클로닝 된 BMP-2의 5' 부위에 TAT 펩타이드(YGRKKRRQRRR) 염기서열을 삽입하였다. 그 후 primer를 이용하여 Influenza virus haemagglutinin-2의 NH₂-terminal 20 amino acid peptide(HA2) (GLFGAIAGFIENGWEGMIDG)를 삽입시킨다. 그 후 X-press tag, 6개의 histidine, 시작 염기서열인 ATG를 삽입하여 벡터를 제작하였다. 형질전환 및 배양, 분리, 정제과정 후 단백질인 TAT-HA2-BMP-2를 채취하였다.

3) 실험 동물

본 연구에서는 체중 250~300g의 웅성 백서(Sprague Dawley rat) 32마리를 사용하였고, 실험 부위로는 두개골을 이용하였다. 실험동물은 연세 임상 의학 연구센터의 동물실험 지침에 따랐다.

2. 실험방법

1) 실험군 설정

백서 두개골 결손부에 아무 처치도 하지 않은 군을 음성 대조군으로 설정하고 collagen sponge만을 이식한 군을 양성 대조군으로, collagen sponge에 각각 TATBMP-2 solution 0.1mg/ml과 TAT-HA2-BMP-2 solution 0.1mg/ml를 적셔 이식한 군을 각각 실험군으로 설정한다. 각 군은 수술 후 2주, 8주 치유기간을 두고 희생시켜 관찰하였으며, 각 군별로 4마리씩 배정하여 모두 32마리를 사용하였다.

2) 백서 두개골 결손부 형성 및 외과적 처치 (Figure 1a, b)

각 군의 백서에 Ketamine hydrochloride**와 Xylazine^{††}을 4:1로 혼합하고 근육주사(70mg/kg)

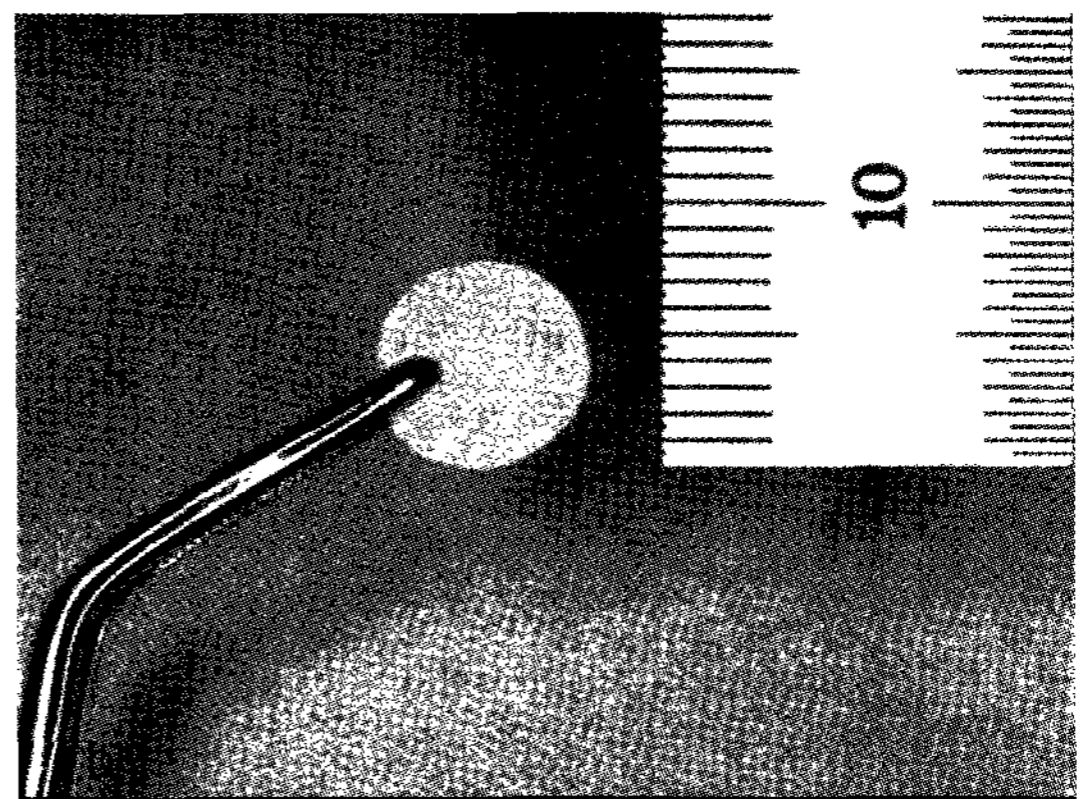
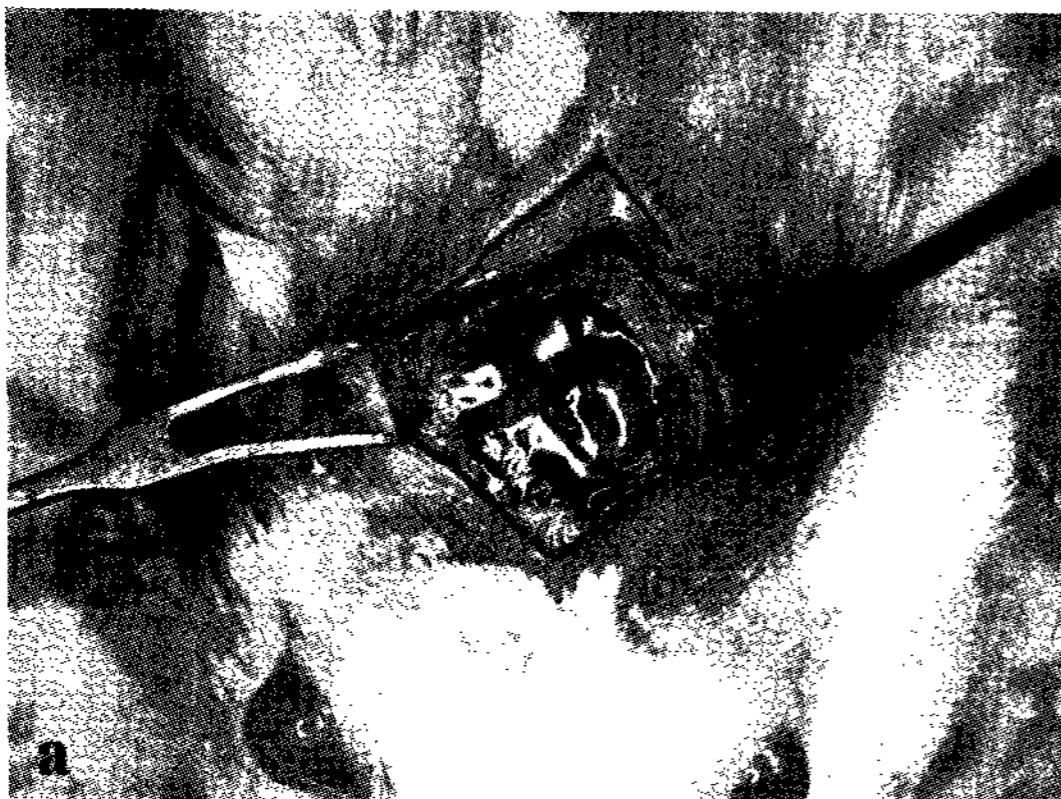


Figure 1. Calvarial defect formation, a, 8mm circumferential defect on rat calvarium, b, collagen matrix as a carrier

- ** Ketalar[®], Yuhan Co., Seoul, Korea
- †† Rompun[®], Bayer Korea, Seoul, Korea
- †‡ 2% lidocaine, 1:100,000 epinephrine, Kangmyung Pharm., Seoul, Korea
- # 3i, Palm Beach Gardens, FL, USA
- §§ Polyglactin 910, braided absorbable suture, Ethicon, Johnson & Johnson Int., Edinburgh, UK
- ## Olympus BX50, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan

III. 결과

1. 임상적 관찰

치유양상은 일반적으로 특이점 없이 각 구간 유사하게 진행되었다. 이식 부위의 노출이나 염증소견, 그리고 수술 부위의 다른 합병증은 나타나지 않았다.

2. 조직학적 관찰

1) 음성대조군

① 2주 소견

결손부는 얇고 성긴 불규칙한 섬유성 결합조직으로 채워져 있으며, 출혈 및 육아조직이 관찰된다. 신생골은 주로 결손부 변연에 국한되어 형성되어 있으며, 조골세포에 의해 둘러싸여 있다. 기존의 잔존골과 신생골 사이에 반전양상(reversal line)이 관찰된다. 신생골이 형성된 부위에는 조골세포가 밀집되어 있는 모습이 관찰된다. 염증세포가 관찰되는 것으로, 연조직 치유와 신생골의 형성이 계속 진행 중임을 알 수 있다. 결손부의 중앙은 형태를 유지하지 못하고 상방조직에 의해 와해되어 있는 양상을 나타내고 있다(Figure 2).

하여 전신마취시켰다. 두부제모를 시행하고 povidone iodine으로 소독한 후 고정하였다. 수술 부위는 2% Lidocaine^{††}으로 침윤 마취한 후 백서의 전두골 전방부에서 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시켰다. 노출된 두개골의 상면에 내경 8mm trephine bur[#]를 이용하여 백서의 경막(duramater)이 드러날 때까지 지름 8mm의 원형 결손을 형성하였다^{8,10,11,23,24}. 실험군에는 각각의 실험재료를 결손부에 위치시켰고, 대조군은 아무 처치도 하지 않았다. 두피를 덮고 4-0 coated Vicryl^{®§}로 봉합하고, 1주 후 발사하였다. 술 후 2주, 8주에 각 군의 동물을 희생하여 두개골 적출하였다.

3. 조직학적 관찰

1) 조직학적 관찰

절제한 조직을 10% 중성 포르말린 용액으로 24시간 고정한 후 5% nitric acid로 3~7일간 탈회하고 통법에 따라 알코올로 탈수한 다음 파라핀에 포매한다. 7 μ m 두께로 80 μ m 간격으로 두고 연속적인 관찰면 절단하여 4개의 박편을 제작하였으며, 각 시편의 중앙 부위를 절단하였다. Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색을 하여 광학 현미경^{##}으로 관찰하였다.

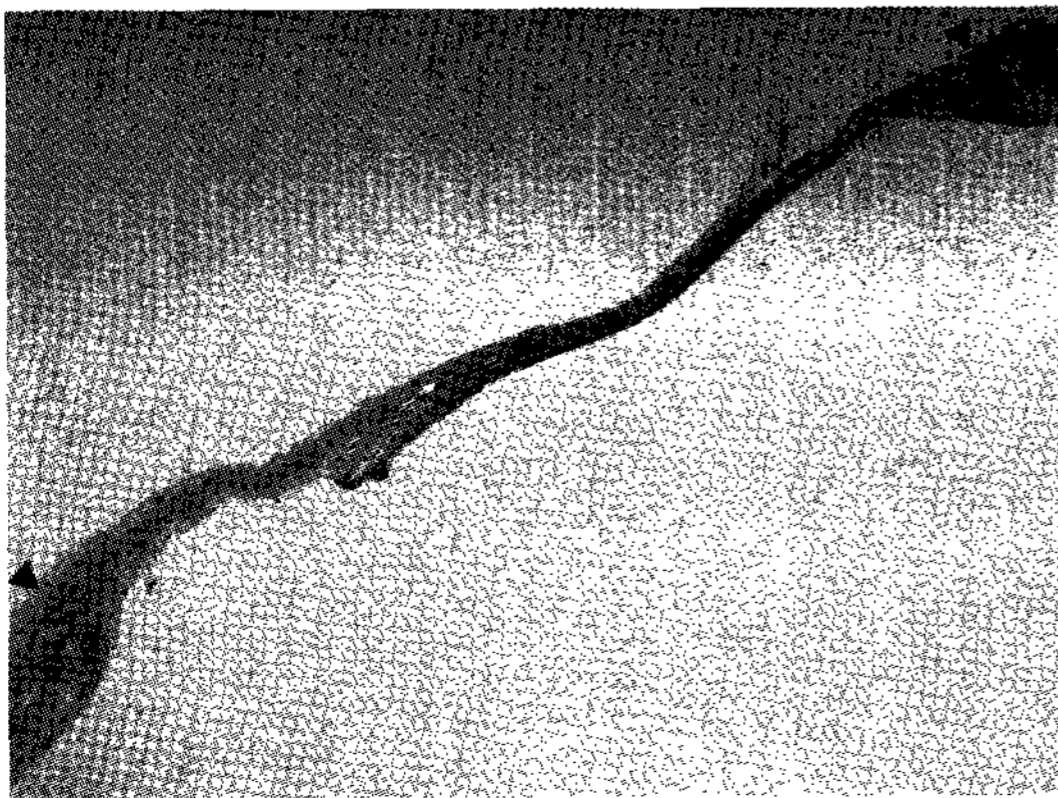


Figure 2. Negative control 2weeks($\times 20$, H-E)

The defect was filled with loose and irregular connective tissues Arrow head = defect margin



Figure 3. Negative control 8 weeks($\times 100$, H-E)

The defect was filled with dense and fibrillar connective tissues Arrow head = defect margin



Figure 4. Positive control(collagen only) 2 weeks($\times 20$, H-E)
Collagen membrane was remained. The new bone regeneration was observed at defect margin. Arrow head = defect margin

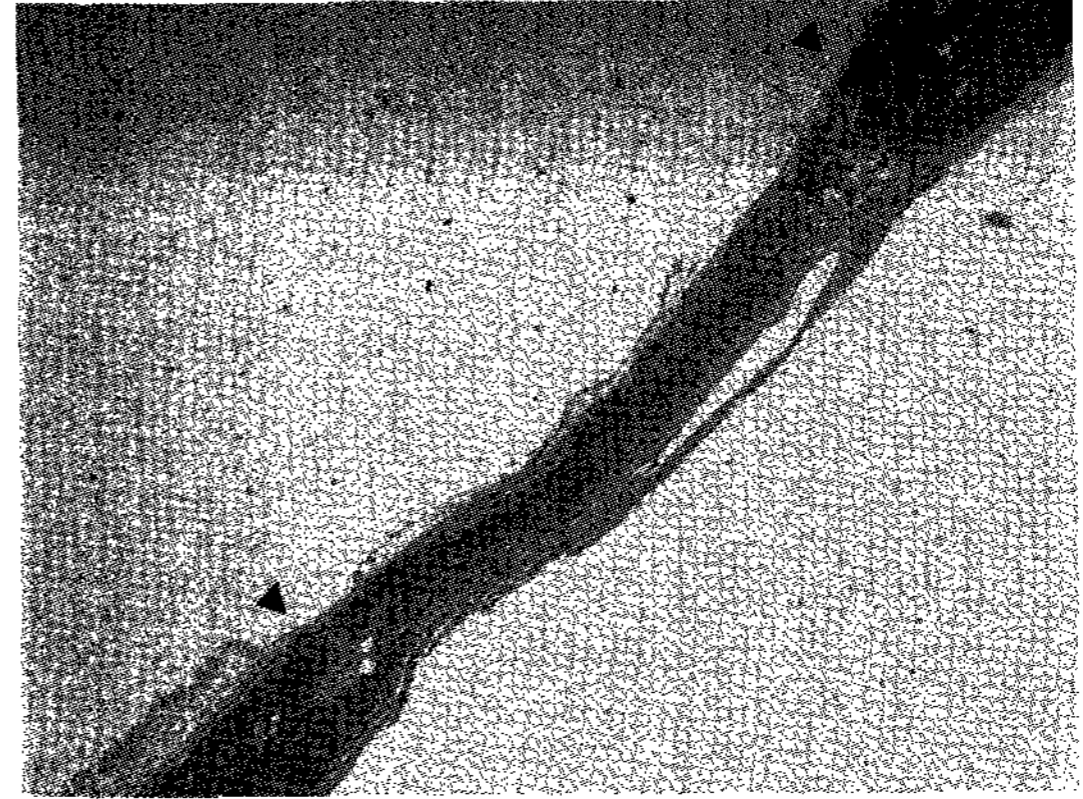


Figure 5. Positive control(collagen only) 8 weeks($\times 100$, H-E)
Collagen membrane was fully absorbed. Defect was filled with the dense, and fibrillar connective tissues. Arrow head = defect margin

② 8주 소견

신생골 주위로 비교적 잘 정돈된 균일한 밀도의 결합조직이 관찰되고 있으나, 여전히 결손부 중앙에는 성긴 결합조직이 관찰된다. 신생골 말단에서는 조골세포들이 줄지어 있으나 골성조직은 관찰되지 않는다(Figure 3).

2) 양성대조군

① 2주 소견

결손 부위는 collagen으로 대부분 채워져 있으며, 미량의 신생골이 결손 변연부 및 중앙부에서 관찰된다. collagen의 흡수 과정으로 여겨지는 다핵 거대세포가 관찰된다. 신생골의 주변에서는 조골세포들이 관찰되며, 신생혈관화 과정도 관찰된다(Figure 4).

② 8주 소견

결손 부위로 얇은 결합조직이 형성된 것이 관찰되고 염증세포의 침윤은 없었다. collagen은 모두 흡수되어 관찰되지 않는다. 밀집된 결합조직이 일정한 방향성을 갖고 나열되어 있다(Figure 5).

3) 실험군

실험 동물간 조직학적 결과는 다소 상이한 결과가 나타났다. 신생골 형성이 없는 경우 이식되었던 car-

rier가 확인되었고 collagen의 흡수과정으로 여겨지는 거대 다핵 세포들이 collagen 주위로 관찰되었다. 일반적으로 2주 소견시 결손부 내에 흡수되지 않은 collagen이 관찰되었으며, 적혈구의 침착 및 활발한 혈관형성 과정이 관찰되었다. TATBMP-2에 비해 TAT-HA2-BMP-2에서 골결손부 변연에서 활발한 골화과정이 관찰되었다. 8주 소견시 TATBMP-2에서 신생골 형성은 미미하였다. 결손 부위로 얇은 결합조직이 형성된 것을 관찰할 수 있었고 염증세포의 침윤은 없었다. collagen은 모두 흡수되어 관찰되지 않았다. TAT-HA2-BMP-2군에서 4개체중 1개체에서 골결손부를 완전히 신생골로 채워진 양상이 관찰되었다. 나머지 개체에서는 collagen이 완전히 흡수되어, 일정한 방향성을 갖는 결합조직으로 결손부가 대체되었다.

(1) 0.10 mg/ml 농도 TATBMP-2

① 2주 소견

결손부 내에 아직 흡수되지 않은 collagen이 남아 있었으며 collagen의 흡수과정이라 할 수 있는 다핵 거대세포가 주위로 관찰된다. 신생골이 형성된 경우, collagen 내부 및 주위로 신생골이 관찰된다. 신생골 주변으로 골아세포가 줄지어 배열되어 있다. 골결손부 변연으로부터 신생골이 형성된 것을 볼 수



Figure 6. 0.10mg/ml TATBMP-2 2weeks(×20, H-E)

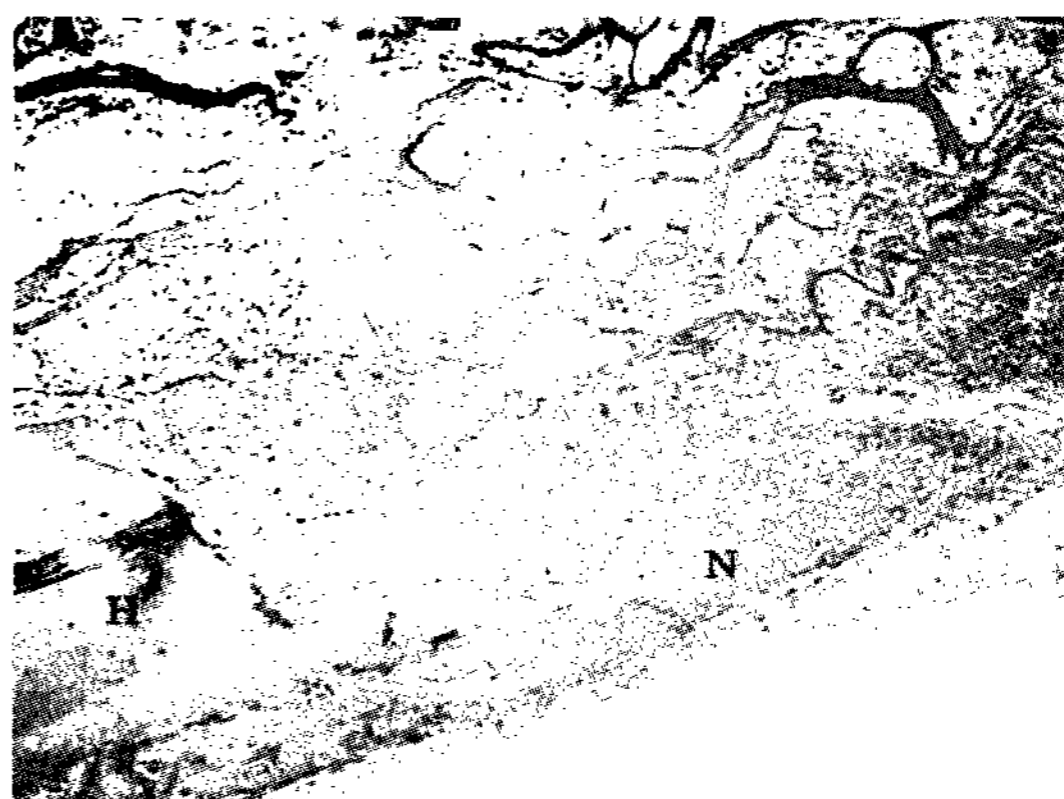


Figure 7. 0.10mg/ml TATBMP-2 2weeks(×100, H-E)

Multinucleated giant cell was observed around collagen membrane. Arrow head=defect margin(× 20, H-E) New bone formation and reversal line were observed in defect margin. N: new bone, h: host bone(×100, H-E)

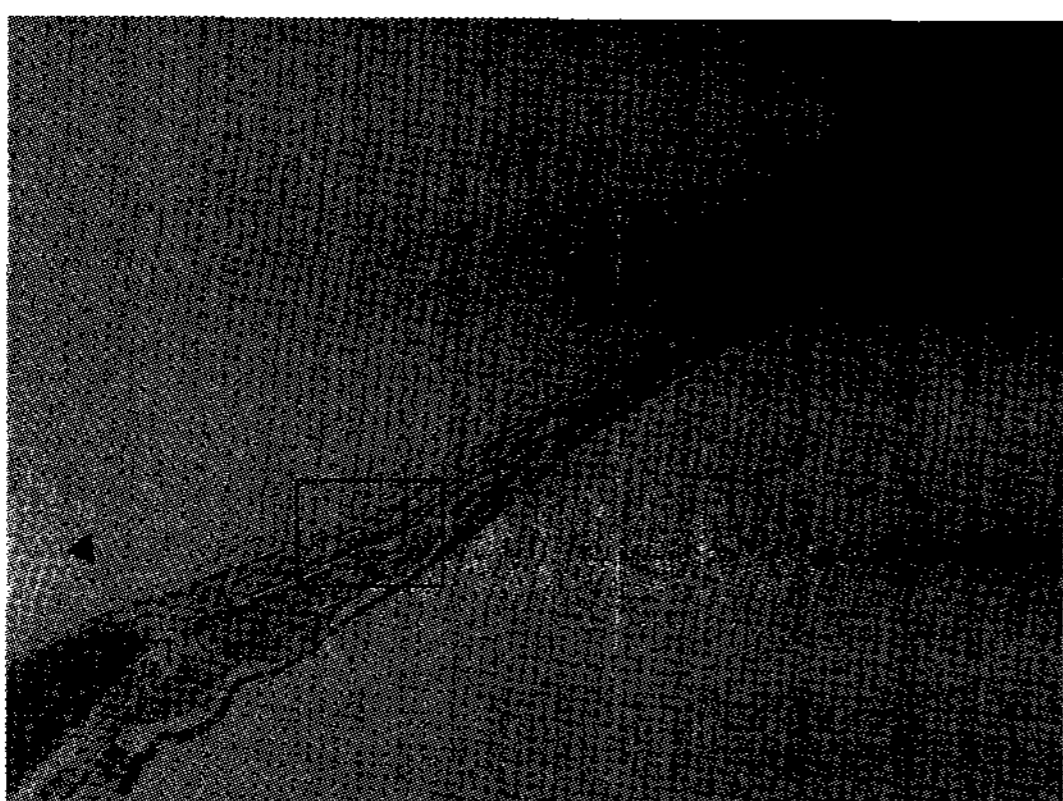


Figure 8. 0.10mg/ml TATBMP-2 8weeks(×20, H-E)

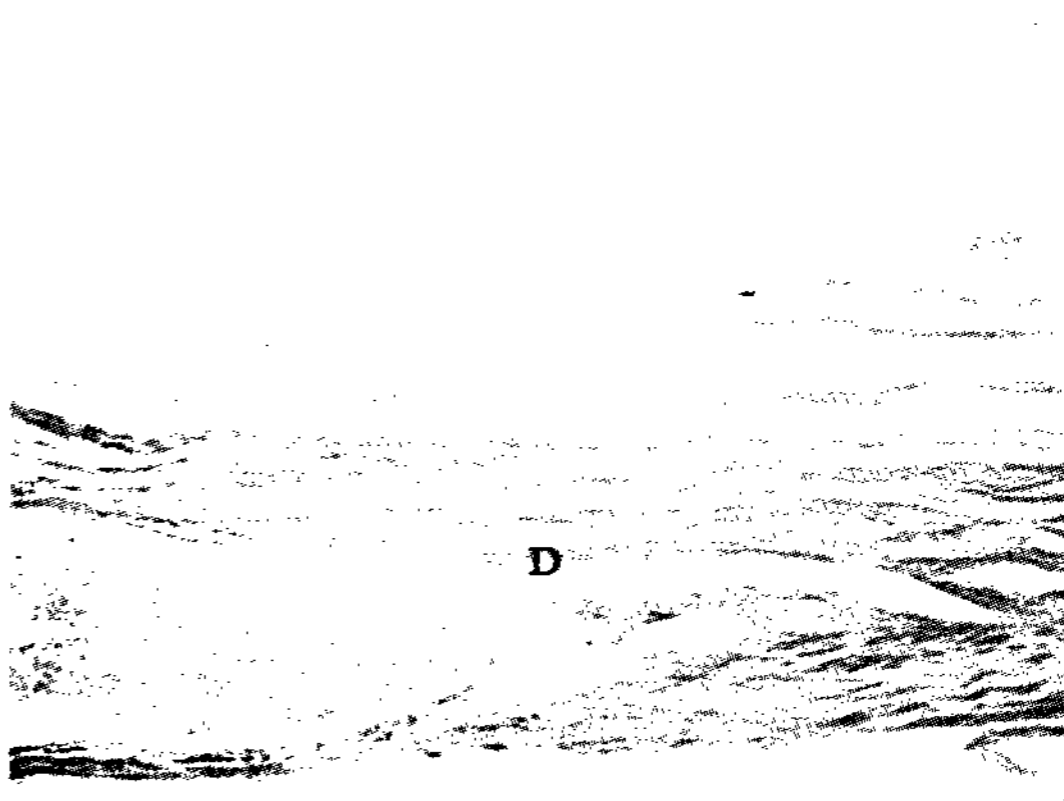


Figure 9. 0.10mg/ml TATBMP-2 8weeks(×100, H-E)

Most collagen membrane was absorbed. New bone formation was more increased than 2 weeks group. Arrow head=defect margin(× 20, H-E) There were dense, fibrous connective tissues. D: dense connective tissues(× 100, H-E)

있다(Figure 6, 7).

② 8주 소견

전체적으로 얇은 결합조직이 형성된 것을 관찰할 수 있고 염증세포의 침윤은 없었다. collagen은 모두 흡수되어 관찰되지 않는다. 신생골 형성은 2주에 비해 증가된 양상을 띄고 있으며, 계속해서 골형성이 진행중임을 관찰할 수 있으나 그 양은 미미하였다(Figure 8, 9).

(2) 0.10mg/ml 농도 TAT-HA2-BMP-2

① 2주 소견(Figure 10, 11)

골 결손부 내에 염증세포와 흡수되지 않은 colla-

gen이 남아있으며, 결손부의 중앙에는 적혈구의 침착 및 신생혈관화 과정도 관찰된다. 골결손부 변연에서 활발한 골화과정이 진행되고 있음을 볼 수 있다. 신생골 주변을 둘러싸고 있는 조골세포들이 관찰된다.

② 8주 소견 (Figure 12, 13)

골 결손 변연부는 물론 결손부 중앙 부위에서 신생골의 형성이 관찰된다. 대부분의 결손부가 골로 대체된 것을 볼 수 있다. 대부분의 collagen은 모두 흡수되어 관찰되지 않는다. 대조군 및 TATBMP-2 군에 비해 뚜렷이 형성된 신생골이 관찰된다.

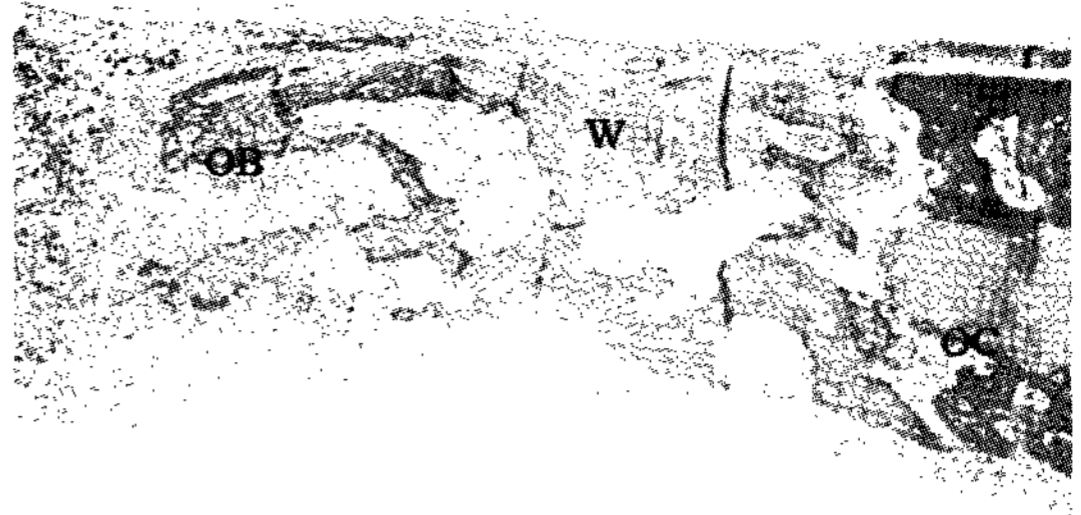


Figure 10. 0.10mg/ml TAT-HA2-BMP-2 2weeks($\times 20$, H-E) Figure 11. 0.10mg/ml TAT-HA2-BMP-2 2weeks($\times 100$, H-E)
Active bone formation was observed at the defect margin, Arrow head=defect margin($\times 20$, H-E) Woven bone and connective tissue which included osteoclast, osteoblasts and vessels were observed, W: woven bone, OC: osteoclast, OB: osteoblast($\times 100$, H-E)

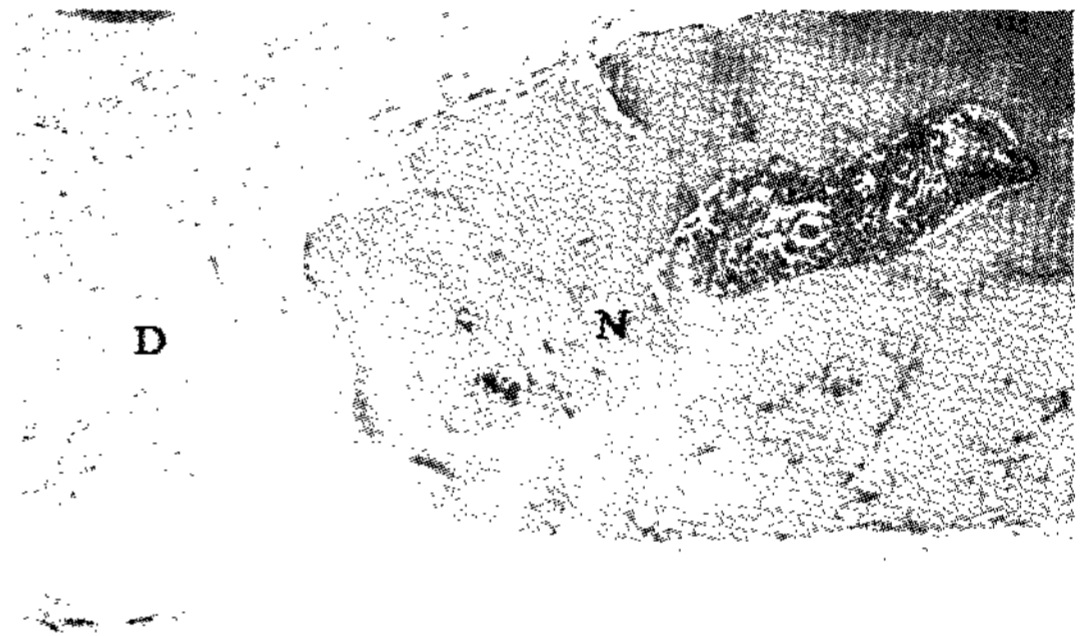
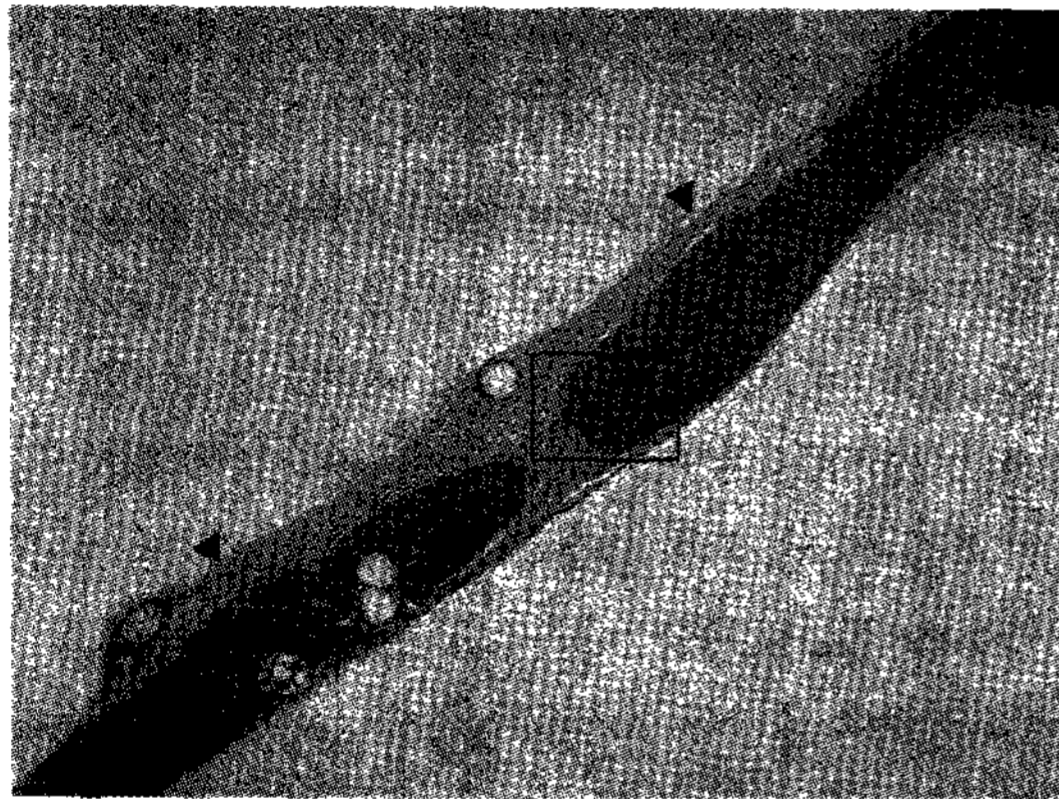


Figure 12. 0.10mg/ml TAT-HA2-BMP-2 8weeks($\times 20$, H-E) Figure 13. 0.10mg/ml TAT-HA2-BMP-2 8weeks($\times 100$, H-E)
Bone defect was almost filled with new bone. ($\times 20$, H-E)
Most collagen membranes were absorbed, New bone formation was to the center of defect, N: new bone, D: dense connective tissue($\times 100$, H-E)

IV. 고안

BMP가 소의 탈회골에서 분리 정제된 이후, 수많은 BMP유전자군이 cloning되면서, BMP단백질의 생물-생화학적 특성에 대한 연구가 진행되어 왔다. BMP-1은 골형성 능력과는 상관없는 matrix metalloproteinase 유전자로 분류되고, 그 외에는 BMP-2에서 BMP-15까지 cloning되어 있다²⁵⁾. 그 중 BMP-2, -4, -7 유전자는 골형성 능력이 탁월하고 임상 적용가능성이 높아 수많은 연구가 진행되었다^{26,27)}. 일반적으로 고농도로 농축한 BMP는 수용성 형태의 단백질로서 혈액이나 체액으로 빠르게 확산

되어 국소적 효과가 떨어지는 문제점이 있으며, 따라서 이 단백질을 어떻게 운반하고 점진적으로 유리 되도록 하느냐가 중요하였고 이제까지 이에 관한 여러 운반매체나 이식재에 대한 연구가 주를 이루어왔다. 또한 성장인자, 즉 단백질 자체를 적용할 때 발생하는 문제점과 운반매체(delivery vehicle)의 용해성 등의 문제를 해결하기 위해 최근에는 바이러스 등을 이용하여 유전자를 전달하는 방법, 즉 DNA 전달체계(DNA delivery system)가 그 대안으로 연구된 바 있다^{28,29)}. BMP-2 유전자를 결합시킨 adenoviral vector를 제조하여 토끼의 대퇴부 골결손 부위에 직접 주사하는 방법으로 골형성효과가 연구

되었다³⁰⁾. 하지만, 이러한 유전자 전달법은 정상세포의 유전자 변형가능성과 유전자 발현을 조절할 수 없다는 결정적인 문제로 인해 임상 적용가능성은 매우 낮은 상황이다. 따라서 BMP와 같이 유용한 분비 단백질을 충분한 임상적인 안정성과 유효성을 확보하면서 쉽고 대량으로 생산할 수 있는 방법으로 PTD를 이용한 단백질 전달법이 고안되었다. 1988년 Frankel 등은 PTD라고 불리는 작은 아미노산 구조가 단백질과 같은 거대분자를 세포 내로 자발적으로 침투 또는 전달할 수 있음을 밝혔다¹³⁾.

본 연구는 음성 백서의 두개골 결손부에 단백질 전달 영역 함유 재조합 골형성 단백질(TATBMP-2)과 이에 HA2를 적용시켜 변형한 TAT-HA2-BMP-2를 적용하여 골재생 효과를 평가하는 것을 목적으로 시행하였다. 백서 두개골에 trephine bur를 이용하여 직경 8mm의 원형 결손부를 형성하고 음성대조군에는 아무것도 이식하지 않고, 양성대조군에는 collagen만을, 실험군에는 농도 0.10mg/ml인 TATBMP-2와 TAT-HA2-BMP-2를 collagen을 carrier로 적용시킨 후 결손부에 이식하였다. 술 후 2주, 8주에 희생하고 치유결과를 조직학적으로 비교 관찰 평가하였다.

이번 연구에서는 백서의 두개골 결손부 모델을 사용하였는데, 이는 다른 동물실험 모델과 비교하여 접근성, 재현성이 좋고 간편하므로 골재생 물질을 연구하는데 효과적이며 편리한 모델로 알려져 있다. 미성숙한 개체는 성숙한 개체에 비해 치유능력이 우수하므로 250~300g의 성체를 사용하였으며, 암컷의 경우 호르몬의 변화나 임신 등에 의해 결과에 영향을 끼칠 수 있어 수컷만을 사용하였다^{10-12, 24)}. 이 모델에서 사용한 8mm의 원형결손은 쥐의 임계크기 결손(critical size defect)으로, 이는 아무런 처치를 하지 않으면 10% 이하의 골재생을 이루는 가장 작은 크기의 결손을 일컫는다^{24,31)}.

일반적으로 rhBMP-2는 0.05mg/ml 이상의 농도일 때 rat calvarial defect에서 우수한 골형성 효과를 나타낸다고 보고된다¹¹⁾. 효과적인 적정 rhBMP-2 처치 농도에 대하여는 아직 연구중이지만 골형성능

은 일정 농도 즉, 역치 농도 이상의 rhBMP-2 농도에 비례한다고 보고된다. 물론 세포의 활성도는 역치 농도 이상에서도 계속적으로 높아지지만 동물 실험에서는 이러한 역치 농도 이상의 농도에서는 농도간의 비례적 관계는 볼 수 없다. 역치 농도 이상에서는 rhBMP-2의 농도 의존성이 떨어진다는 것이다. 또한 우수한 골형성을 얻기 위해서는 적절 농도의 BMP가 이식부위로 전달될 수 있어야 한다. rh-BMPs는 수용성 물질이므로 적용부위에 적절히 전달되지 않으면 그 효과가 감소되며⁸⁾, rh-BMPs의 효과를 극대화하기 위해서는 적절한 양과 농도, 적용시간 등이 중요하다고 하였다³²⁾. 그러므로, rh-BMPs를 효과적으로 전달하며 전달되는 동안 유지될 수 있는 적절한 전달체의 사용은 필수적이라고 할 수 있다^{8,10,33)}. 앞서 기술한 바와 같이 이상적인 전달체를 찾기 위한 다양한 노력들^{1,9-12)}이 계속되고 있으나, 현재까지 이에 대해 명확히 규명된 바는 없다. 적절한 전달체를 사용한다 하더라도 상당량의 BMP가 있어야 하고 또한 고등동물일수록 우수한 골형성을 기대하기 위해서는 보다 높은 농도의 BMP가 필요하다고 알려져 있다.

최근, 세포막 투과가 어려운 단백질을 효과적으로 세포 내부로 전달할 수 있는 단백질 전달 영역에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특정 아미노산 배열로 이루어진 이러한 펩타이드는 자발적으로 세포막을 투과하여 세포 내로 투과하여 들어갈 수 있다는 특성을 가진다¹³⁾. 이 중 대표적인 펩타이드는 HIV에서 유래한 transactivator of transcription로서 단독으로도 세포 내 투과가 가능하지만 다른 단백질 특히 거대 분자의 단백질을 용합한 상태에서도 세포막을 통과할 수 있다고 보고된다^{19,34)}. 이외에도 VP-22, ANTP, 그리고 Kaposi FGF 또는 arginine/lysine-rich peptide의 작은 단백질 부분이 세포 내로 침투할 수 있고 또한 단백질을 세포질과 핵으로 전달할 수 있다고 보고되어지나 정확한 기전에 대하여는 아직 연구중으로 보고된다. 이러한 전달 및 침투과정은 세포 종류와는 큰 상관성이 있다. 이러한 한 침투과정은 4°C에서 잘 이루어지는 것으로 보

아 온도 차이에 따른 에너지 의존적인 과정이라 볼 수 있으나 정확한 기전은 상반된 논란의 여지가 남아있다. 세포 내로 전달된 TATBMP-2는 heat shock protein에 의하여 재구조화 과정을 거친 후 활성화된 형태의 BMP를 분비하기 위하여 furin cleavage된다는 것을 유추할 수 있었다. 이는 TATBMP-2 단백질을 in vitro에서 반응시켰을 때 약 43-kd의 N-terminal fragment가 관찰되었기 때문이다. 활성화된 분비 BMP-2 단백질은 하나의 disulfide 결합에 의해 두 개의 동일한 펩타이드가 연결된 dimer로 구성된다. 이 때, 각각의 펩타이드는 114개의 아미노산으로 구성되며 내부에 존재하는 7개의 시스테인 단발기 중 하나가 다른 펩타이드의 동일 부위와 disulfide 결합을 하고 있고 나머지 6개 시스테인은 동일 아미노산에서 3개의 disulfide 결합을 하고 있는 독특한 3차원 구조를 가지게 된다^{35,36}. 연구결과에서 보여졌듯이 TATBMP-2 및 이를 개선한 TAT-HA2-BMP-2의 골재생 효과에는 다소 개체간 차이점이 나타났다. 일반적으로 2주간의 치유 기간을 둔 TATBMP-2를 적용한 개체에서는 골재생의 효과는 미미했고, TAT-HA2-BMP-2를 적용한 개체에서는 활발한 변연골 재생을 확인할 수 있었다. 주로 생성된 신생골은 결손부 변연 부위에서 관찰되었으며, 결손부 중심부는 흡수되지 않은 collagen 다발이 남아있는 양상이었다. 일반적으로 8주 후의 치유기간 후 조직 소견시 잔존해 있던 collagen들은 대부분 흡수된 양상을 보였으며, 일정한 방향성을 갖는 밀집된 결합조직이 관찰되었고, 신생혈관조직이 골 결손부 내부에 형성되어 있었다. TATBMP-2의 신생골 형성은 8주 소견시 모든 개체에서 신생골 형성은 미미하였다. 반면에 고른 결과를 보여주진 못했지만, TAT-HA2-BMP-2군에서는 결손부 내부가 명확히 신생골로 재생된 개체가 발견되었다. 반면에, 골형성이 TATBMP-2 혹은 양성, 음성대조군에 비해 뚜렷하지 못한 개체도 있었다. 이는 TATBMP-2를 개선한 TAT-HA2-BMP-2가 골재생에는 효과가 있지만, 효율이 떨어지는 것을 의미한다. PTD 융합 단백질이 세포 내로 전달되었을 때 세

포질과 핵에 균일하게 분포하는지, 아니면 특정한 세포 내 소기관에 분포를 보이는지에 대한 보고는 거의 없다. TATBMP-2가 효과적인 기능을 하기 위해서는 세포질 내에 함유된 후 다시 핵내로 전송되어야 한다. 핵내 전송이 실패되고 핵 주변으로 위치하게 되면 원하던 TATBMP-2의 기능은 떨어져 rhBMP-2 생산 및 세포 외로의 rhBMP-2 분비는 이루어지지 않는다. 따라서 TATBMP-2로 인한 골형성 효과가 줄어들게 된다. 또한 일반적으로 골이 형성되기 위해서는 일정한 기간동안 효과가 지속되어야 하는데, TAT과 같은 PTD를 이용할 경우 분리 정제된 단백질이 표면에너지를 가져 인접세포나 조직에 수 분 이내에 상당량의 단백질이 투과되고, 1~2시간 내에 대부분 전달된다는 점이 단점으로 작용할 수 있다. 이러한 결과를 볼 때 TATBMP-2가 가지는 한계성은 세포질 내에서 균일한 핵내 전송이 일어나지 못하고, 짧은 기간에 유리된다는 점이다. 일반적으로 TAT 융합 단백질은 세포내 전송시 endosome 복합체 형태로 존재하게 된다³⁷. 이러한 형태로는 핵내 전송이 용이하지 않다. 하지만, endosome을 분해할 수 있는 물질 즉, chloroquine, polyethylenimine을 처치하게 되면 TAT 융합 단백질의 핵내 전송이 수월해질 수 있다. 하지만 이러한 방법은 독성을 나타낼 수 있기 때문에 치료 방법으로는 적절치 못하다. 이에 HA2 peptide를 TAT과 같은 PTD에 연결하여 처치할 경우 chloroquine 등에서 우려되던 독성에 대한 염려 없이 macropinosome을 통해 단백질의 전송이 용이함이 보고되어졌다²¹. 이러한 결과로 HA2와 결합된 HIV-1 TAT 융합 단백질은 TAT 융합 단백질에 비해 효과적으로 적용될 수 있음을 의미한다. 실제로 백서의 원형골결손부에서 TAT-HA2-BMP-2를 적용시킨 경우, HA2를 결합시키지 않은 TATBMP-2에 비해 뚜렷이 골형성이 된 것을 볼 수 있었다. 모든 개체에서 일관적인 효과를 보이지 않아 개선의 여지는 있지만, 명확하게 양성 및 음성대조군, TATBMP-2 실험군과 비교시 효과가 있음을 보여주었다. HA2는 세포막의 sialic acid를 포함한 수용기에 결합하여 엔도솜 안으로 들

어오고, 엔도솜을 조절함으로써 단백질의 기능을 활성화시킨다. HA2가 TATBMP-2를 개선시켜 명확한 효과를 보이지만, 일관적인 결과를 보여주지 못하는 것은 TAT-HA2-BMP-2가 균일하게 용액에 퍼져 전달이 되어야 하는데, 소수성을 띄는 성질로 말미암아 서로 응집하는 현상이 강하여, 실제 목표로 하는 세포들에 효율적으로 전달이 되지 않는 것이 원인으로 사료된다.

이에 TAT-HA2-BMP-2를 보다 균일하게 확산시켜, 목표로 하는 세포에 적용할 수 있는 방법에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

본 연구는 세포 내로 자발적 투과가 가능한 단백질 전달 영역(protein transduction domain:PTD)을 가진 HIV-1 펩타이드를 이용한 재조합 TATBMP-2와 추가로 HA2를 삽입시켜 변형한 TAT-HA2-BMP-2를 박테리아에서 생합성 및 정제 후 이들을, 0.10mg/ml의 농도로 collagen을 전달체로 백서 두개골 결손부 모델에 적용하였다. 2주 및 8주 치유기간을 둔 후 조직학적으로 평가하였으며, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. TATBMP-2의 골재생 효과는 조직학 소견에서 음성대조군 및 양성대조군에 비해 뚜렷하지 않았다.
2. TAT-HA2-BMP-2의 골재생 효과는 조직학 소견에서, 음성대조군 및 양성대조군, TATBMP-2군과 비교하여 일부 개체에서 명확한 골형성이 나타났다.

본 연구인 백서 두개골 결손부에서 PTDBMP-2인 TATBMP-2와 TAT-HA2-BMP-2를 collagen을 전달체로 하여 0.1mg/ml의 농도로 적용시켜 보았을 경우 TATBMP-2의 골재생 효과는 미미하였고, TAT-HA2-BMP-2군에서 골이 뚜렷이 형성된 개체가 있었다. 하지만, 모든 개체에서 일관적인 결과를 보이진 못했다. 이에 TAT-HA2-BMP-2를 보다 균일하게 확산시

켜, 목표로 하는 세포에 적용할 수 있는 방법에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. Clin Orthop Relat Res 2002;4-10.
2. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 1988; 242:1528-1534.
3. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:9843-9847.
4. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. J Biol Chem 1992;267: 20352-20362.
5. Gitelman SE, Kobrin MS, Ye JQ, et al. Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. J Cell Biol 1994;126: 1595-1609.
6. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, et al 3rd. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. J Bone Joint Surg Am 1994;76:827-838.
7. Cook SD, Salkeld SL, Patron LP. Bone defect healing with an osteogenic protein-1 device combined with carboxymethylcellulose. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005;

- 75:137–145.
8. Hong SJ, Kim CS, Han DK, et al. The effect of a fibrin–fibronectin/beta–tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein–2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials* 2006;27:3810–3816.
 9. Choi SH, Kim CK, Cho KS, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein–2/absorbable collagen sponge (rhBMP–2/ACS) on healing in 3–wall intrabony defects in dogs. *J Periodontol* 2002;73:63–72.
 10. Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein–4 with carriers in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2003;74:787–797.
 11. Pang EK, Im SU, Kim CS, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein–4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol* 2004;75:1364–1370.
 12. Hyun SJ, Han DK, Choi SH, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein–2, –4, and –7 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;76:1667–1674.
 13. Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988;55:1189–1193.
 14. Schwarze SR, Dowdy SF. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:45–48.
 15. Lewin M, Carlesso N, Tung CH, et al. Tat peptide–derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2000;18:410–414.
 16. Tseng YL, Liu JJ, Hong RL. Translocation of liposomes into cancer cells by cell–penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study. *Mol Pharmacol* 2002;62:864–872.
 17. Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994;269:10444–10450.
 18. Park J, Ryu J, Kim KA, et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J Gen Virol* 2002;83:1173–1181.
 19. Fawell S, Seery J, Daikh Y, et al. Tat–mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:664–668.
 20. Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppe M, et al. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV–1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem* 2003;278:34141–34149.
 21. Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT–HA fusogenic peptide enhances escape of TAT–fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 2004;10:310–315.
 22. Michiue H, Tomizawa K, Wei FY, et al. The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin–2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine–mediated p53 protein transduction. *J Biol Chem* 2005;280:8285–8289.
 23. Han DK, Kim CS, Jung UW, et al. Effect of a fibrin–fibronectin sealing system as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein–4 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;

- 76:2216–2222.
24. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986;299–308.
 25. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2220–2224.
 26. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000;142:9–21.
 27. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233–241.
 28. Winn SR, Hu Y, Sfeir C, Hollinger JO. Gene therapy approaches for modulating bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;42:121–138.
 29. Baum BJ, Kok M, Tran SD, Yamano S. The impact of gene therapy on dentistry: a revisiting after six years. *J Am Dent Assoc* 2002;133:35–44.
 30. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther* 2000;7:734–739.
 31. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 1982;196:100–109.
 32. King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 2002;73:925–936.
 33. Wikesjo UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, et al. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 1999;26:392–400.
 34. Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol* 2000;10:290–295.
 35. Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:878–883.
 36. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83–A Suppl 1:S1–6.
 37. Amano M, Chihara K, Kimura K, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997;275:1308–1311.

Bone regenerative effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 employed protein transduction domain

Sung-Won Jung¹, Nam-Hee Kim², Jong-In Yook², Chang-Sung Kim¹
Hyung-Jun Kim³, Kyoo-Sung Cho¹

1. Department of periodontology, Research institute for periodontal Regeneration, College of Dentistry, Yonsei University
2. Department of Oral pathology, Oral Cancer Research institute, College of Dentistry, Yonsei University
3. Department of Oral & Maxillofacial surgery, College of Dentistry, Yonsei University

Bone morphogenetic proteins(BMPs) are regarded as members of the transforming growth factor- β superfamily with characteristic features in their amino acid sequences. A number of studies have demonstrated the biologic activities of BMPs, which include the induction of cartilage and bone formation. Recently there was a attempt to overcome a limitation of mass production, and economical efficieny of rh-BMPs. The method producing PTD by using bacteria have advantages of acquiry a mass of proteins. Hences, a new treatment which deliver protein employed by protein transduction domain(PTD) has been tried.

The purpose of this study was to evaluate the bone regenerative effect of TATBMP-2 and TAT-HA2-BMP-2 employed by PTD from HIV-1 TAT protein for protein translocation in the rat calvarial model. An 8mm calvarial, critical size osteotomy defect was created in each of 32 male Spraque-Dawley rats(weight 250~300g). The animals were divided into 4 groups of 32 animals each (4 animals/group/healing interval). The defect was treated with TATBMP-2/ACS(Absorbable collagen sponge) (TATBMP-2 0.1mg/ml), TAT-HA2-BMP-2/ACS(TAT-HA2-BMP-2 0.1mg/ml), ACS alone or left untreated for surgical control(negative control). The rats were sacrificed at 2 or 8 weeks post-surgery, and the results were evaluated histologically. The results were as follows:

New bone formation were not significantly greater in the TATBMP-2/ACS group relative to negative, and positive control groups.

New bone was evident at the defect sites in TAT-HA2-BMP-2/ACS group relative to negative, positive control and TATBMP-2 groups.

There were a little bone regeneration in TATBMP-2 groups. While, enhanced local bone formation were observed in TAT-HA2-BMP-2 group. But, The results was not the same in all rat defects. Therefore, further investigations are required to develop a method, which disperse homogenously, and adhere to target cells.