

미니돼지에서 다능성 피부유래 전구세포의 추출과 이의 다배엽 세포로의 분화유도에 대한 연구

최문정¹ · 변준호¹ · 강은주² · 노규진² · 김종렬³ · 김옥규³ · 박봉욱¹

¹경상대학교 의학전문대학원 치과학교실 구강악안면외과, ¹경상대학교 건강과학연구원,

²경상대학교 수의과대학 수의산과학, ³부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:588-593)

ISOLATION OF PORCINE MULTIPOTENTIAL SKIN-DERIVED PRECURSOR CELLS AND ITS MULTILINEAGE DIFFERENTIATION

Moon-Jeong Choi¹, June-Ho Byun¹, Eun-Ju Kang², Gyu-Jin Rho²,
Uk-Kyu Kim³, Jong-Ryoul Kim³, Bong-Wook Park¹

¹Department Oral & Maxillofacial Surgery, School of Medicine and Institute of Health Science, Gyeongsang National University;

²College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University; ³Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University

There are increasing reports regarding regeneration of the defected tissues using tissue engineering technique. In this technique, multipotential stem cells are essential. There are many potential sources of adult stem cells, such as bone marrow, umbilical cord blood, fat, muscle, dental tissues and skin. Among them, skin is highly accessible and easily obtained with a minimum of donor site complications. Moreover, skin is an abundant adult stem cell sources and has the potential for self-replication and immune privilege. In this study, we isolated skin-derived precursor cells (SKPs) from the ear of adult miniature pigs. In these SKPs, the expression of transcriptional factors, Oct-4, Sox-2, and Nanog were detected by RT-PCR. *In vitro* osteogenesis and adipogenesis were observed at 3 weeks after transdifferentiations as assayed by positive von Kossa and Oil-red O staining, respectively. In addition, expression of osteocalcin and osteonectin in the osteogenic differentiation medium and PPAR γ 2 and aP2 in the adipogenic differentiation medium were detected by RT-PCR. *In vitro* neurogenesis of porcine SKPs was observed during 24 and 72 hours after treatment of neurogenic differentiation medium. The results of this study suggest that SKPs demonstrate the properties of pluripotency or multipotency and multi-lineage differentiation. This indicates that autogenous SKPs are a reliable and useful source of adult stem cells for regenerative medicine.

Key words: Skin-derived precursor cells (SKPs), Tissue-engineering, Adult stem cell.

I. 서 론

최근까지 골, 연골, 신경, 피부 등 인체의 한 부분이 결손된 경우 이를 회복하기 위해 결손부위의 특징에 맞는 다양한 회복 방법들이 소개되어 왔다. 하지만, 결손조직을 인공 보형물 등으로 회복하기 보다 결손조직 자체로 회복하기 위하여는 조직 이식술이 필요하다. 이때는 이식조직의 특징에 따라 자가조직 이식 외에도 이종조직 및 동종조직, 또는 합성조직 이식으로도 비교적 양호한 결과를 얻는 경우도 있지만, 이식조직의 면역반응 위험을 줄이면서 생착율을 높이기 위해서는 자가조직

이식이 필수적이다. 하지만, 자가조직 이식은 공여부 채취를 위한 이차적인 수술이 필요하고, 이로 인해 환자에게 신체적 및 경제적 고통을 가중시키는 단점이 있다.

이에 최근에는 조직공학을 이용하여 결손된 조직을 회복하려는 연구들이 활발히 이루어 지고 있다. 특히 자가조직의 일부를 최소한으로 채취한 후 조직공학을 이용하여 필요한 조직을 필요한 양으로 만들고 이를 다시 이식하는 자가조직을 이용한 조직공학은 면역반응을 해결할 수 있고, 종교 및 윤리적 문제에 제한을 받지 않기에 미래의 조직재생을 위하여 활발히 연구되어야 할 분야이다. 이러한 조직공학을 이용한 재생의학을 위해서는 다양한 줄기세포 또는 미분화 전구세포가 필수적으로 필요하다. 줄기세포는 크게 배아(embryonic) 줄기세포, 태아(fetal) 줄기세포, 그리고 성체(adult) 줄기세포로 나뉜다¹⁾. 현재는 종교-윤리적 및 실용적인 면에서 줄기세포의 임상연구는 성체줄기세포에 대한 연구가 주를 이루며, 지금까지의 연구들에서 성체줄기세포는 골수(bone marrow), 췌장(pancreas), 지방(fat), 근육(muscle), 혈액(circulating blood), 제대혈(umbilical cord

박 봉 욱

우편번호 660-702 경남 진주시 칠암동 90

경상대학교 의학전문대학원 치과학교실 구강악안면외과

Bong-Wook Park

Dept. of OMFS, School of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Chilam-dong 90, Jinju-city, Gyeongnam 660-702, Republic of Korea

Tel.: +82 55 750 8264 Fax: +82 55 761 7024

E-mail: parkbw@snu.ac.kr

* 이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2007-331-E00236).

blood), 골막(periosteum), 모낭(hair follicle) 및 피부(skin) 등의 다양한 조직에서 추출과 배양에 성공 하였다³. 하지만, 향후 임상적용을 고려해 볼 때 골수나 근육, 지방 등의 신체 내부에 있는 조직을 채취하는 과정은 여전히 침습적이고, 출혈, 동통, 감염 등의 합병증을 유발할 가능성이 있다.

피부조직을 이용한 성체줄기세포의 추출은 비교적 최근에 연구되는 분야이지만, 피부가 신체의 외부에 넓게 분포하기에 채취가 쉽고 빠르며, 공여부 합병증을 최소화 할 수 있고, 면역 반응에 제한을 거의 받지 않는 장점이 있다^{3,4}. 피부조직은 진피(dermis)와 표피(epidermis)로 나뉘며, 이 내부에는 표피줄기세포(epidermal stem cells), 간엽줄기세포-유사세포(mesenchymal stem-cell-like cells), 그리고 피부유래 전구세포(skin-derived progenitors) 같은 다양한 기원의 줄기세포가 존재한다고 알려져 있다⁴. Toma 등⁵은 설치류의 피부에서 처음으로 줄기세포를 추출하여 이를 피부유래 전구세포(skin-derived precursors, SKPs)라 명명하였다. 그 후 돼지 태아 피부⁶ 및 인간의 피부에서^{3,7,8}도 줄기세포의 추출 및 배양에 성공하였다. 최근에는 인간 피부유래 전구세포를 이용한 *in vitro* 상에서 골화에 대한 연구⁹나 동물의 피부유래 전구세포를 이용한 말초신경재생에 대한 연구⁹ 등, 피부유래 전구세포를 재생의학에 적용시키려는 연구가 일부 진행되었다.

따라서, 본 연구는 향후 인간 피부유래 전구세포의 연구를 위한 전단계 연구로, 실험동물에서 피부유래 전구세포를 추출 및 배양하고 이의 원시적이고 다능적인 특징을 확인하며, 동시에 피부유래 전구세포를 *in vitro* 상에서 골세포, 지방세포 및 신경세포 등 다배엽성 세포들로 각각 분화시켜 이의 분화 가능성과 특징을 관찰하는 것에 목적이 있다. 이를 위해 미니돼지의 이부에서 피부유래 세포를 추출하고 이를 배양시켜 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)를 이용하여 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, 그리고 Sox-2의 발현을 관찰하고, 이 피부유래 세포를 골세포, 지방세포, 그리고 신경세포로 각각 분화시켰다. 분화된 골 및 지방세포에 대하여는 조직학적 염색으로 분화된 세포를 관찰하고, RT-PCR로 골기질 단백질 및 지방세포 표시자의 발현을 각각 관찰 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 실험동물 및 피부유래 전구세포의 추출

본 연구를 위해 체중 25 kg 내외의 생후 6개월에서 1년 사이의 미니돼지 4 두를 이용하며, 모든 실험연구는 경상대학교 동물실험 윤리기준 (Animal Center for Medical Experimentation at Gyeongsang National University)을 준수하면서 이루어 졌다. 실험 동물은 4 mg/kg of azaperone (Stresnil®, Janssen-Cilag, Belgium)을 근육내 주사하여 진정시켰으며, 이후 10 mg/kg of tiletamine-zolazepam (Zoletil®, Virbac, France)을 정맥내 주사하여 전신마취 하였다. 미니돼지의 한쪽 이부에 Betadine 액으로 소독하였고, 2% lidocaine HCL with 1:100,000 epinephrine을 피하주사 한 후 이

침부를 완전 절제하였다. 공여부 상처는 전기소작기로 지혈한 후 3-0 Nylon으로 일차 봉합 하였다.

실험실에서 채취한 이침부 조직에 제모를 시행한 후 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 함유된 소독된 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Invitrogen, MD, USA)로 수 차례 세척하였다. 채취한 조직에서 표피(epidermis) 및 진피(dermis)와 모낭, 피지샘 및 땀샘 등이 포함된 전층의 피부를 분리하였다 (Fig. 1. A). 분리된 전층 피부를 약 1-3 mm²의 조각으로 분리하여 10 % fetal bovine serum (FBS; Invitrogen), 10 ng/ml endothelial growth factor (EGF; Sigma, MO, USA), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Sigma), 100 U/ml penicillin (Sigma), 그리고 100 µg/ml streptomycin (Sigma) 와 0.25 µg/ml Amphotericin B (Invitrogen)을 첨가한 2 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (Invitrogen) 배지가 함유된 35 mm 또는 60 mm 크기의 조직배양판 (tissue culture plates, Nunc, Denmark)에 넣고 38.5 oC, 5 % CO₂ 와 humidity 조건에서 조직배양 하였다 (Fig. 1. B). 일차배양 2일 후 피부조직에서 탈락된 세포가 배지에 부착된 것을 확인하고 남은 조직절편은 forceps으로 제거하였다. 이 시기에는 배지를 하루에 한번씩 교체하고, 피부절편을 제거한 후에는 1주에 2번씩 배지를 교체하며, confluent cells은 0.25 % trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Invitrogen)으로 처리 후 계대배양(subculture) 하였다.

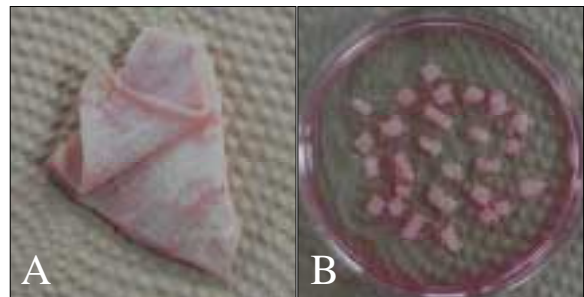


Fig. 1. Sculpturing of harvested porcine ear skin (A) and they were cultured in primary tissue culture plates (B).

2. 배양된 피부유래 세포에서 RNA추출과 RT-PCR을 통한 초기 전사인자의 발현

배양된 피부유래 세포에서 줄기세포 특성을 확인하기 위해 3번의 계대배양 후의 피부유래 세포를 배지에서 추출하여 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, Sox-2에 대한 각각의 발현을 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 검사하였다. 배양된 세포에서 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하고, PCR 증폭을 위한 template인 cDNA는 oligo-dT primer를 가진 Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen)를 이용하여 55 °C에서 30분간 합성하였다. PCR은 Maxime PCR Premix (iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 시행하였다.

Oct-4, Nanog, Sox-2 유전자의 primer는 다른 연구¹⁰에서 소개

된 것을 사용하였으며, RNA 추출과 RT-PCR 전과정의 평가를 위해 실험실 보관 유전자(house keeping gene)를 RT-PCR 과정에 GAPDH로 사용하였다. Oct-4의 염기서열은 F, 5' -AGGTGTTACGCCAAACGAACC-3' and R, 5' -TGATCGTTTGCCCTTCTGGC-3' (335 bp) 였고, Nanog의 염기서열은 F, 5' -ATCCAGCTTGTCCCAAG-3' and R, 5' -ATTTTCATTCGCTGGTTCTGG-3' (438 bp) 였으며, Sox-2의 염기서열은 F, 5' -GCCTGGGCGCCGAGTGGA-3' and R, 5' -GGGCGAGCCGTTTCATGTAGGTCTG-3' (443 bp) 였다. GAPDH는 F, 5' -GGGCATGAACCATGAGAAGT-3' and R, 5' -AAGCAGGGATGATGTTCTGG-3' (230 bp)의 염기서열을 가지는 house keeping gene을 선택하여 사용하였다. PCR은 95 °C 에서 3분간 denaturation과 60 °C 에서 30초간 annealing, 72 °C 에서 45초간 elongation, 그리고 72 °C 에서 10분간 extension을 35에서 40 cycles로 실시하였다. 이후 1 % agarose gel 과 1 µg/ml ethidium bromide 하에서 전기영동 (electrophoresis)으로 분리하고 자외선 조명하에서 사진촬영 하였다.

3. 피부유래 전구세포의 골, 지방, 신경 세포로의 분화유도

추출 및 배양된 피부유래 전구세포에서 골세포로 분화시키기 위해 3차 계대배양된 피부유래 전구세포가 약 70 % confluence에 도달하면 10 nM dexamethasone, 10 mM sodium β-glycerophosphate, 그리고 50 µM ascorbic acid를 첨가한 DMEM 배지 (골세포유도배지)로 교체한다. 지방세포유도를 위해서도 추출한 피부유래 전구세포를 10 nM dexamethasone, 0.5 mM indomethacin, 5 µg/ml insulin, 100 mM 3-sodium isobutyl-1-methylxanthine, 그리고 10 % FBS를 첨가한 DMEM 배지 (지방세포 유도 배지)로 교체하였다. 각각의 배지는 1주에 2번씩 교체하면서 3주 동안 배양하고, 분화된 세포는 조직화학염색과 RT-PCR을 통해 확인하였다.

신경세포 유도를 위해서는 추출한 피부유래 전구세포를 10 % FBS, 10 ng/ml의 bFGF, 그리고 0.2 µl/ml의 β-mercaptoethanol을 첨가한 DMEM 배지에서 약 24시간 처치한다. 그 후 2 % DMSO, 200 µM BHA (butylated hydroxyanisole, 25 mM KCl, 2 mM Valproic acid, 10 µM Forskolin, 1 µM Hydrocortisol, 5 µg/ml Insulin 과 2 mM L-glutamine without FBS을 함유한 DMEM 배지(신경세포유도배지)에서 약 72시간 배양하였다.

4. 조직염색 및 RT-PCR을 이용한 골 및 지방세포의 평가

골세포 유도배지에서 골기질을 평가하기 위하여 von Kossa 염색을 실시하였으며, 이를 위해 3주동안 골세포로 유도 배양된 세포를 PBS로 세척하고, 4 % 중성 formaldehyde에 30분간 실온에서 고정하였다. 증류수로 세척 후 5 % silver nitrate solution (Sigma)을 처리하고 암실에서 1 시간 유지하였다. 증류수로 세척하여 여분의 silver nitrate solution을 제거하고, 색의 발현을 위해 sodium carbonate/formaldehyde solution을 수분간 처리하였다. 잔존의 silver nitrate는 5 % sodium thiosulfate를 처리하여 중화시

켰다. 세포핵은 hematoxylin 액으로 5분간 대조염색 하였다.

지방세포로 유도 분화된 세포는 Oil-red O 염색으로 지방세포 유무를 확인하였으며, 이를 위해 지방세포 분화배지에서 3주간 배양된 세포를 PBS로 세척과 4 % formaldehyde로 고정한 후 6 ml의 stock Oil-red O (Sigma)에 4 ml의 이중 증류수를 첨가한 Oil-red O working solution을 처리하고 실온에서 1시간 유지하였다. 증류수로 수 차례 세척과 건조 후 광학현미경하에서 관찰 하였다.

또한, RT-PCR을 통해 골세포와 지방세포로 유도된 세포의 특성을 확인 하였으며, 골세포로 유도된 세포에서는 골기질 단백질인 osteocalcin 과 osteonectin의 발현을 관찰하였고, 지방세포로 유도된 세포에서는 지방세포 표시자인 peroxisome proliferators activated receptor gamma 2 (PPARγ2)와 adipocyte fatty acid-binding protein (aP2)의 발현을 각각 관찰 하였다. Osteocalcin의 염기서열은 F, CTGGACCAACATCTTGAGCA and R, ACCCCTTTGGTGGTGTGTA (205 bp)이였으며, osteonectin의 염기서열은 F, 5' -TCCGGATCTTTCCTTTGCTTTCTA-3' and R, 5' -CCTTCACATCGTGGCAAGAGTTG-3' (189 bp) 이었다. PPARγ2의 염기서열은 F, 5' -ATGGTGACTTGGGAAATGGA-3' and R, 5' -ATAATGGTTTGTGCCCATC-3' (229 bp)이었고, aP2의 염기서열은 F, 5' AACCCAACCTGATCATCACTG-3' and R, 5' -TCTTTCCATCCCCTTCTGC-3' (192 bp) 이었다. PCR 과정의 평가를 위해 GAPDH를 사용하면서, 전술한 방법으로 PCR 과정을 진행 하였다.

III. 연구결과

미니돼지의 이부에서 추출한 세포는 처음 1주간의 초기 배양시 다양한 크기와 형태의 세포들이 관찰되고 다양한 형태의 세포군락(colony) 형성도 관찰 되었다 (Fig. 2.). 이러한 초기 세포들은 배양 2-3주 후의 2차 및 3차 계대배양 후 비교적 균일한 형태의 세포군으로 관찰 되었다 (Fig. 3. A). 이 시기 3차 계대배양 후 균일한 형태로 관찰되는 피부유래 세포에서 RT-PCR을 통해 초기전사인자인 Oct-4, Sox-2, 그리고 Nanog의 발현을 모두 관찰 할 수 있었다 (Fig. 3. B).

골세포 유도 배지에서 배양한 지 3주 후 von Kossa 염색에서 흑갈색으로 염색되는 광화된골기질을 관찰 할 수 있었고, 같은 시기 골세포로 유도 분화된 세포에서 RT-PCR을 통해 골기질 단백질인 osteocalcin과 osteonectin의 발현을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4. A & C). 또한, 피부유래 전구세포를 지방세포 유도 배지에서 3주간 배양한 후 Oil-red O 염색에 붉게 양성으로 나타나는 지방세포를 관찰 할 수 있었고, 이 시기 지방조직 유도 세포에서 지방세포 표시자인 PPARγ2와 aP2의 발현을 RT-PCR을 통해서 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4. B & D). 신경세포로 분화 유도한 실험에서는 골 및 지방 세포 유도와 달리 신경세포 유도배지 처치 약 24시간 후부터 신경의 형태가 관찰되기 시작하여 72시간 후에는 완전한 신경세포의 형태가 거의 모든 배지에서 관찰 되었다 (Fig. 5).

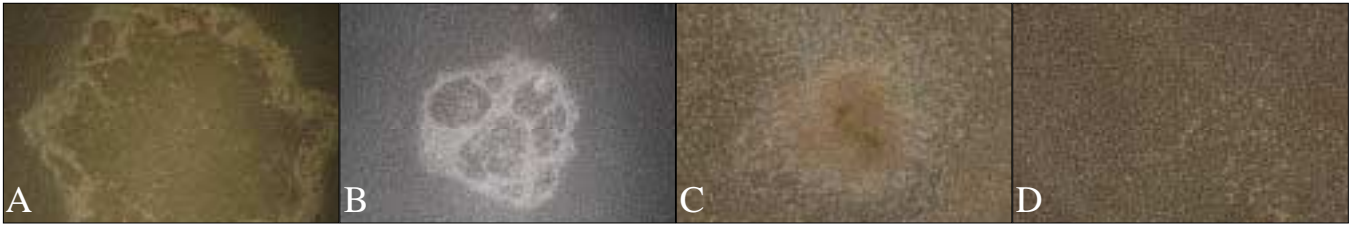


Fig. 2. Seven days after primary culture of porcine ear skin (x40 magnification). In this period (passage 0), heterogenic sharpness and multiple colony formation were shown in the cultured cells.

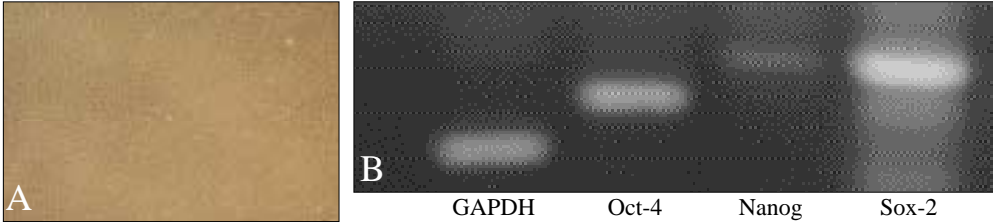


Fig. 3. Three weeks after primary culture. (A) Homogenous skin-derived cells were observed in the medium at passage 2 (x40 magnification). (B) Early transcription factors, Oct-4, Nanog, and Sox-2, were expressed in the cultured skin-derived cells as demonstrated by RT-PCR.

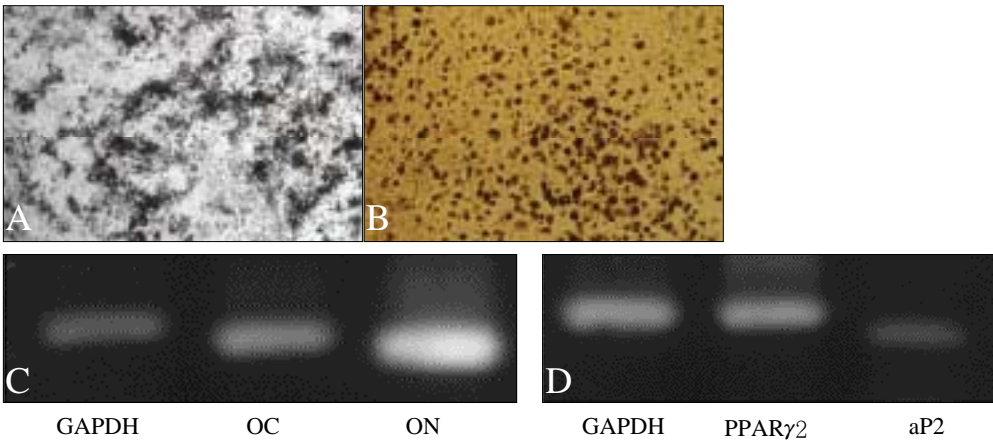


Fig. 4. Additional three weeks osteogenic and adipogenic transdifferentiation of skin-derived precursor cells (A & B, x40 magnification). (A) Positive black colored bone minerals were observed in the osteogenic differentiated cells via von Kossa staining. (B) Positive red colored lipid tissues were observed in the adipogenic differentiated cells via Oil-red O staining. (C) Expression of bone matrix proteins, osteocalcin (OC) and osteonectin (ON), were detected in the osteogenic differentiated cells as determined by RT-PCR. (D) Peroxisome proliferators activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2) and adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) were expressed in the adipogenic differentiated cells by RT-PCR.

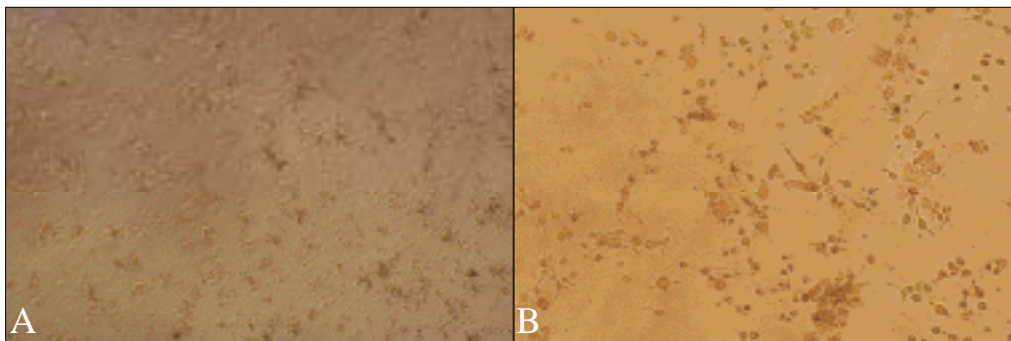


Fig. 5. Neurogenic differentiation of skin-derived precursor cells (A, x100 & B, x200 magnifications). After 72 hours, numerous cultivated nerve cells and fibers were observed in neurogenic medium.

IV. 고찰

줄기세포란 단일세포로서 자가재생(self-renewal) 능력과 성숙된 전구세포 및 최종 목적세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로 정의된다¹⁾. 줄기세포는 그 분화능력에 따라 totipotent (모든 배아 및 배아외적 세포로 분화할 수 있는 능력), pluripotent (배아상태의 모든 세포로 분화될 수 있는 능력), multipotent (두 가지 및 세 가지 배엽의 세포로 분화할 수 있는 능력), oligopotent (multipotent 줄기세포 보다 더 제한적인 배엽의 세포로 분화할 수 있는 능력), 그리고 unipotent (오직 한 가지 성숙된 세포로 분화할 수 있는 능력) 등으로 분류된다¹⁾. 처음으로 다능적인 배아줄기세포(pluripotent embryo stem cells)는 생쥐 배아 포배(blastocysts)의 inner cell mass에서 추출하여 *in vitro* 상에서 배양되었고^{11,12)}, 그 후 배아줄기세포 뿐만 아니라 골수, 지방, 췌장, 혈액, 태반혈액 등의 조직에서 추출 및 배양한 성체 줄기세포들에서도 그 정도와 특징에는 차이가 있지만, multipotent 또는 pluripotent 한 줄기세포의 특징들을 나타내었다¹⁰⁾.

Oct-4¹³⁾, Sox-2¹⁴⁾, 그리고 Nanog¹⁵⁾는 pluripotent embryonic stem cells에 강하게 발현되는 초기 전사인자로, 지금까지 연구에는 인간 및 생쥐의 배아줄기세포에서만 강하게 발현되고, 이를 제외한 postnatal stem cells 인 골수, 제대혈, 양수, 지방, 피부 등의 성체 줄기세포에서는 강하게 발현되지 않는다고 알려져 있다. 이 세가지 전사인자는 최소한 2,260개의 인간 유전자의 프로모터(promoter)에 간여하며, 세 전사인자가 공동으로 간여하는 유전자도 353가지나 된다¹⁶⁾. 따라서 이들 세 전사인자는 공동으로 또는 각자 단독으로 인간 배아줄기세포의 다능성(pluripotency)과 자가재생성(self renewal)을 조절하며, 줄기세포의 전사에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다¹⁰⁾. Carlin 등¹⁰⁾은 돼지의 제대혈(umbilical cord blood)에서 Oct-4, Sox-2, Nanog의 강한 발현을 관찰하였다고 보고하였는데, 이는 인간 배아줄기세포 외에는 이들 초기 전사인자들의 발현이 미약하다는 그동안의 연구결과와 상반된 결과였다. 돼지는 인간을 위한 줄기세포 연구에서 가장 유용한 실험동물로, 돼지 줄기세포에서 이들 전사인자의 발현은 곧 인간 줄기세포에서도 같은 결과를 야기한다고도 할 수 있을 것이다¹⁷⁾. 본 연구에서도 성체 미니돼지의 이부 피부를 채취하여 약 3주간 배양 후 균일한 모양의 세포를 얻었으며, 이 피부기원의 배양된 세포에서 초기전사인자인 Oct-4, Sox-2, 그리고 Nanog의 발현을 모두 관찰할 수 있었다. 이는 본 연구에서 추출 및 배양한 피부유래 세포가 다능성(pluripotent or multipotent)이며, 자가재생성(self renewal)을 갖춘 줄기세포 및 전구세포라는 의미이다.

최근에는 많은 부분에서 이러한 줄기세포 및 전구세포의 필요성이 증가되고 있다. 특히 안면부에는 외상, 종양, 기형 등으로 악골이 결손된 증례가 증가하고 있고, 최근에는 인공치아 식립을 위해 부족한 악골을 증강 시키려는 노력이 계속되고 있다. 이러한 경우 자가골 및 합성골을 사용한 골이식술이나 구강내외의 골신장기를 이용한 골신장술 등의 방법이 악골 결손부를 회복하기 위해 주로 사용되어 왔지만, 자가골 이식술

은 이식골의 생착력이 좋은 반면 공여부 채취를 위한 추가적인 수술로 환자의 불편감 및 합병증 위험성이 증가하고 이식골의 양과 모양이 제한되는 단점이 있다¹⁸⁾. 동종골 및 합성골은 자가골의 훌륭한 대체제로 사용될 수 있지만, 이식골의 골질이 나빠면서 생착과 경화에 많은 시간이 소요되고, 면역반응으로 인해 사용이 제한적이다¹⁹⁾. 골신장술을 이용하여 골결손부를 회복하는 방법은 비교적 최근에 연구되고 임상적으로 시술되는 방법이지만, 이도 신생골의 형태와 양을 조절하기 힘들고, 골신장기를 장착하는 장기간 동안 환자의 불편감이 잔존하는 단점이 있다. 따라서, 조직공학을 이용한 악골재생술은 현실집에서 가장 진보된 치료방법으로 볼 수 있다. 특히 자가조직을 이용한 조직공학적 골재생은 자가골 이식술의 공여부 채취에 따른 불편감과 합병증을 줄일 수 있고, 동종골 및 합성골 사용에 따른 면역거부반응 및 생착 실패 등의 문제를 해결할 수 있다. 지금까지의 연구에서는 조직공학적 골은 주로 골수^{20,21)} 및 자가골조직^{22,23)} 등의 골조직 자체나 골막^{18,24)} 등에서 유래한 세포를 이용하여 연구 되어졌다. 골막은 쉽게 채취할 수 있고, 골세포로도 분화가 용이한 장점이 있다²⁵⁾. 하지만, 골막은 채취 가능한 부위와 양이 제한적이고, 채취 과정 또한 경우에 따라서는 침습적인 단점이 있다. 피부는 인체에서 가장 넓게 분포하고 있으며, 특별한 합병증의 위험 없이 쉽게 채취할 수 있고, 다양한 줄기세포를 함유하고 있는 장점이 있다. 따라서, 피부유래 줄기세포 또는 피부유래 전구세포를 이용한 악골 재생은 향후 골이식술과 골신장술 등을 대체할 수 있는 방법으로 발전시킬 수 있을 것이다.

본 연구에서 추출 및 배양한 피부유래 전구세포를 골세포, 지방세포, 그리고 신경세포로 분화시켰을 때, 모두 각각의 세포들로 분화됨을 관찰하였다. 골세포 유도 배지에서 3주간 배양한 후 von Kossa 염색에서 흑갈색으로 염색되는 골기질을 관찰하면서 osteocalcin과 osteonectin의 발현을 동시에 관찰할 수 있었다. 또한, 지방세포 유도 배지에서도 Oil-red O 염색에 양성으로 나타나는 분화된 지방세포를 관찰할 수 있었고, 지방세포 표지자인 PPAR γ 2와 aP2의 발현을 RT-PCR을 통해서 관찰할 수 있었다. 신경세포 유도배지에서는 약 72시간 후 피부유래 전구세포가 신경세포 형태로 변환됨을 관찰하였는데, 이는 골 및 지방 세포에 비해 피부유래 전구세포에서 신경세포로 유도가 상당히 빠르게 일어난다고 발견이었다. 하지만, 이러한 결과의 원인에 대해서는 아직 명확히 알 수 없으며, 단지 피부세포나 신경세포 모두 같은 외배엽성 기원이라는 것에 그 이유를 추측해 볼 수 있다. 실제로 최근에 실험동물의 말초신경 절단 모델에 피부유래 줄기세포를 사용하여 성공적으로 절단된 신경을 재생하였다는 연구도 있다²⁶⁾. 이러한 결과들로 향후 신경재생 분야에서 피부유래 전구세포가 큰 장점을 가지고 있음을 추측해 볼 수 있다.

또한, 상기 결과와 같이 피부유래 전구세포가 골, 지방 및 신경 등의 다배엽성 세포로 분화하는 것은 선행된 연구에서 골수유래²⁵⁾ 및 췌장유래²⁷⁾ 줄기세포들이 유사하게 다배엽성 세포 및 조직으로 분화한 것과 같으며, 따라서 피부유래 전구세포

도 다른 조직 기원의 성체 줄기세포와 같이 원시적이고 다분화 능력을 가졌다고 볼 수 있다. 또한, 본 연구에서와 같이 피부 유래 전구세포가 두 가지 배엽 이상으로 분화할 수 있으므로 이의 특징은 *multipotent* 하다고 할 수 있을 것이다.

이렇게 외배엽 기원의 피부유래 세포에서 중배엽 기원의 골, 지방, 연골 세포들로 분화되는 것을 탈분화(*transdifferentiation*)라 정의하는데, 이는 원래 배엽의 기능과 특이적인 세포 표지자를 잃고 다른 배엽의 세포로 전환 하는 것을 의미한다¹³. 성체 줄기세포의 이러한 탈분화 능력 때문에 줄기세포의 유연성(*plasticity*) 개념과 분화된 세포의 줄기세포로의 재분화(*redifferentiation*) 등에 대한 개념들이 성립 되게 되었다¹⁴. 본 연구 결과로 피부유래 줄기세포의 탈분화 능력을 증명하였으며, 이는 피부유래 전구세포가 골, 지방, 신경 세포들 외에도 인체의 모든 조직의 세포로 분화가 가능하다는 의미이다. 향후 이러한 다능적이고 다분화 능력을 갖춘 피부유래 전구세포를 이용한 다면 다양한 재생의학의 발전을 도모할 수 있을 것이다.

V. 결 론

저자들은 본 연구에서 미니돼지 이부의 피부를 채취해 약 2-3주간 배양 후 균일한 모양의 줄기세포로 추정되는 세포를 추출하였으며, 이 세포에서 초기전사인자인 *Oct-4*, *Sox-2*, 그리고 *Nanog*의 발현을 RT-PCR로 확인 하였다. 이는 본 연구에서 추출한 세포를 다능성(*pluripotent* or *multipotent*)의 특징을 가진 피부유래 전구세포로 간주 할 수 있었다. 이 피부유래 전구세포를 약 3주간 추가적으로 유도 배양하여 각각 골세포와 지방세포로 성공적으로 탈분화 되는 것을 관찰 하였고, 유도 배양된 세포들에서 각각 골기질 단백질인 *osteocalcin* 및 *osteonectin*의 발현과 지방세포 표지자인 *peroxisome proliferators activated receptor gamma 2 (PPARγ2)*와 *adipocyte fatty acid-binding protein (aP2)*의 발현을 각각 관찰 할 수 있었다. 또한 피부유래 전구세포를 신경세포로 분화 유도 한지 24-72 시간 만에 신경세포로 변환되는 것을 관찰 하였다. 향후 추가적인 연구가 진행되어야 하겠지만, 본 연구 결과로 다양한 분야의 재생의학에 보다 채취가 간단하면서 다능성의 특징을 갖춘 피부유래 전구세포를 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Wagers AJ, Weissman IL: Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-648.
2. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al: Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 2006;85:966-979.
3. Buranasinsup S, Sila-asna M, Bunyaratvej N, Bunyaratvej A: *In vitro* osteogenesis from skin-derived precursor cells. *Develop Growth Differ* 2006;48:263-269.
4. Shi C, Zhu Y, Su Y, Cheng T: Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trend Biotech* 2006;24:48-52.
5. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al: Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3:778-784.

6. Dyce PW, Zhu H, Craig J, Li J: Stem cells with multilineage potential derive from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:651-658.
7. Kajahn J, Gorjup E, Tiede S, von Briesen H, Paus R, Kruse C, et al: Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *Eur J Cell Biol* 2008;87:39-46.
8. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD: Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005;23:727-737.
9. Marchesi C, Pluderer M, Colleoni F, Belicchi M, Merzagalli M, Farini A, et al: Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *GLIA* 2007;55:425-438.
10. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D: Expression of early transcription factors *Oct-4*, *Sox-2* and *Nanog* by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4:8-20.
11. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.
12. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634-7638.
13. Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P: New type of POU domain in germ line-specific protein *Oct-4*. *Nature* 1990;344:435-439.
14. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R: Multipotent cell lineages in early mouse development depend on *Sox2* function. *Genes Dev* 2003;17:126-140.
15. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al: Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113:643-655.
16. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al: Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005;122:947-956.
17. Bucher P, Morel P, Buhler LH: Xenotransplantation: an update on recent progress and future perspectives. *Transpl Int* 2005;18:894-901.
18. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittlinger M: Making bone: implant into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation- a preliminary report. *J Cranio Maxillofac Surg* 2003;31:34-39.
19. Wheeler SL, Holmes RE, Calhoun CJ: Six-year clinical and histologic study of sinus-lift grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:26-34.
20. Chen F, Feng X, Wu W, Ouyang H, Gao Z, Cheng X, et al: Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:822-827.
21. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T: Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:589-597.
22. Fuerst G, Tangl S, Gruber R, Gahleitner A, Sanroman F, Watzek G: Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: preliminary findings. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:733-740.
23. Springer IN, Nocini PF, Schlegel KA, Santis DD, Park J, Warnke PH, et al: Two techniques for the preparation of cell-scaffold constructs suitable for sinus augmentation: step to clinical application. *Tissue Engineering* 2006;12:2649-2656.
24. Park BW, Hah YS, Kim DY, Kim JR, Byun JH: Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *Arch Oral Biol* 2007;52:983-989.
25. Zou L, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, et al: Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern. *J Orthop Res* 2008;26:56-64.