

## 말초혈액 유래 간엽전구세포의 골분화

은석찬 · 김진희 · 허찬영 · 백룡민 · 장 학 · 민경원

서울대학교 의과대학 성형외과학교실

### Osteogenic Differentiation of Circulating Peripheral Blood Derived Mesenchymal Progenitor Cells

Seok Chan Eun, M.D., Jin Hee Kim, M.D.,  
Chan Yeong Heo, M.D., Rong Min Baek, M.D.,  
Hak Chang, M.D., Kyung Won Minn, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul  
National University College of Medicine, Korea

**Purpose:** There are some reports presenting that peripheral blood contain circulating hematopoietic cells as well as, in significantly smaller quantities, mesenchymal stem cells. The purposes of this study is to isolate and characterize circulating mesenchymal progenitor cells with osteogenic potential from human peripheral blood.

**Methods:** Human buffycoat containing mononuclear cells was harvested from peripheral blood of normal persons and isolated using a density gradient centrifugation and serially subcultured in osteogenic media for 1-4 weeks. The proliferation capability, phase-contrast microscopy, transmission electron microscopy, immunophenotype FACS analysis, Alizarin red staining and RT-PCR assays for osteogenic differentiation potential were performed.

**Results:** The phenotype of cultured cells changed from small round or cuboidal cells at passage 1 into large spindle-shaped fibroblastic morphology cells at passage 4. Surface marker expressed CD14, but did not express CD34, CD80, CD83. Strong positive staining was observed for Alizarin reds in osteogenic medium on day 14, Using RT-PCR, the mRNA levels of bone-

specific genes, such as ALP, c-bfa-1 and osteocalcin were detected.

**Conclusion:** A new subset of peripheral blood derived progenitor cells described here has the ability to proliferate and differentiate into osteogenic cell lineages in vitro, and to be candidate for regenerative therapy.

**Key Words:** Peripheral blood, Mesenchymal Progenitor cell, Osteogenesis

### I. 서 론

과거 골질환에 대한 치료의 발전은 기계적 안정성, 골이식술 및 수술수기의 개선 등으로 이루어 졌으나 현대에는 새로이 개발되고 있는 세포분자 생물학의 도움으로 골절치유 촉진에 괄목할 발전이 있어 왔다. 실험적으로 전기 자기장, 탈무기질화 한 골기질, 골형성 단백질 및 자가골수세포를 이용하여 골절의 지연 유합이나 불유합을 치료할 수 있는 잠재력을 밝혀냈으며, 최근 줄기세포 치료가 재생이 불가능한 것으로 알려졌던 조직에서 발생한 질환에 대한 새로운 치료대안으로서 그 가능성을 주목받고 있다.<sup>1</sup> 이러한 줄기세포의 응용을 통한 난치병 정복은 21세기 생명과학계의 중요한 이슈로 부각되었으며 현재 골수, 지방, 체대혈 유래 성체줄기세포 등을 중심으로 연구되고 있다. 골수는 골수천자, 지방은 지방흡입을 시행해야 하고, 체대혈은 태아에서만 얻을 수 있다는 나름대로의 단점을 가지고 있지만 말초혈액 유래 줄기세포는 위의 세 가지와 비교했을 때 쉽고 반복해서 많은 양을 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있고 면역적으로 거부반응이 적어 동종이식 시 우월한 효과를 가진다.<sup>2,4</sup> 체대혈과 말초순환 혈액 내 조혈모세포의 존재는 잘 알려져 있으며, 최근 말초혈액에서 분리배양한 줄기세포가 다른 중간엽 줄기세포와 유사한 특성을 보여 여러 조직으로 분화가 가능함이 보고되었다.<sup>5,6</sup> 본 연구에서는 건강한 인체의 말초 혈액으로부터 줄기세포를 함유하고 있는 것으로 추정되는 단핵구 세포층을 분리하고 배양한 후, 골형성 유도배지를 가하여 골조직 특이세포로 분화되는 능력이 있음을 확인하고자 본 실험을 진행하였다.

Received January 21, 2008  
Revised March 18, 2008

**Address Correspondence:** Seok Chan Eun, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 300 Gumi-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-707, Korea. Tel: 031) 787-7223 / Fax: 031) 787-4055 / E-mail: sceun@snubh.org

\* 본 연구는 대한성형외과개원의협회의 연구진흥비와 과학기술부/한국과학재단 우수 연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음(R11-2005-065).

\* 본 논문은 2007년 제 62차 대한성형외과학회 학술대회에서 구연 발표하였음.

## II. 재료 및 방법

가. 말초혈액에서 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양  
건강한 일반 성인남녀 18명으로부터 350 mL의 말초혈액을 채취하여 Buffy coat층을 분리한 다음 Ficoll-hypaque 용액(1.077)과 1:2의 비율로 섞어 1500 X g으로 20°C에서 30분간 원심분리하였다(Fig. 1). 그 후 1800, 1200, 800 X g으로 각각 10분간 원심 분리하여 시험관으로부터 단핵구층(mononuclear cell layer)을 고농도로 추출하고 10% 우태아 혈청과 100 Unit/mL의 penicillin-streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM; GIBCO, Grand island, NY, USA)에 부유시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3-5일간 배양하여 바닥에 부착 성장하는 세포만을 선택적으로 지속 배양하였으며, 배지는 1주일에 2회 교환하였다. 본 연구는 연구자들이 속해있는 기관의 윤리위원회의 심사를 통과하였으며 연구에 조직을 기증한 환자들 모두 충분한 설명을 듣고 기꺼이 연구참여에 동의하였다.

나. 유세포 분석(FACS, Immunophenotyping)

배양된 세포를 Phosphate buffered saline(PBS; GIBCO, Grand island, NY, USA)로 세척하여 4°C에서 5분간 원심분리 후 수확하였고, 4% paraformaldehyde로 실온에서 10분간 고정한 후 0.1% Triton X-100/PBS로 세척하였다. 세포는 poly-L-lysine으로 coating된 slide에 실온에서 1시간동안 incubation하여 slide에 부착하였다. 비특이적인 반응을 제거하기 위해 PBS, 1% BSA, 11%

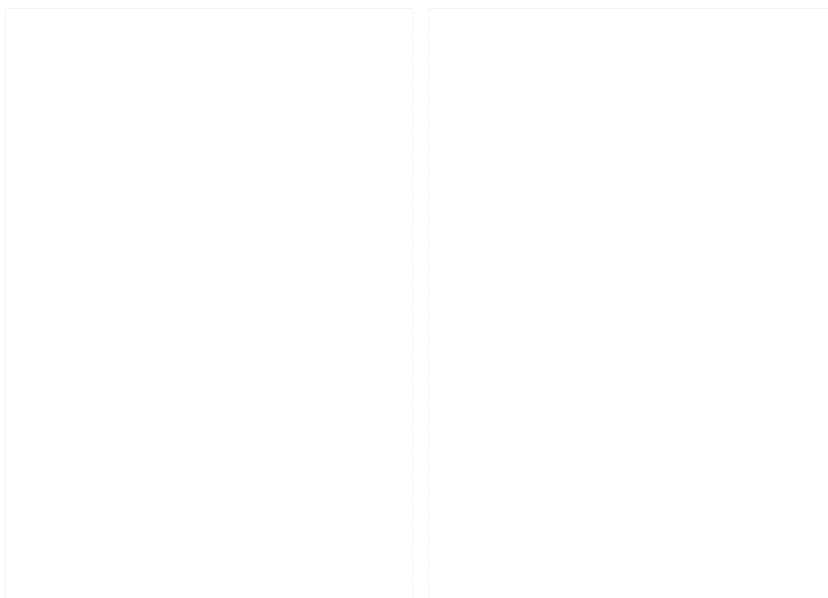
serum로 구성된 blocking buffer(Sigma, St. Louis, U.S.A.)로 30분간 incubation하였다. 그 후 blocking buffer에 적정량 희석된 fluorescein이 부착된 anti-CD14, CD34, CD80, CD83(Sigma, St. Louis, U.S.A.)의 단클론항체를 포함한 FCB 용액에서 반응시킨 후 분석하였다.

다. 골조직 특이세포 분화 및 염색

2주간 DMEM에서 배양된 간엽 줄기세포는 100 nM dexamethasone, 10 nM  $\beta$ -glycero-phosphate, 0.05 mM L-ascorbic acid-2-phosphate(Sigma, St. Louis, U.S.A.)로 구성된 골형성 유도용액을 추가하여 배양하였으며 2-3일 간격으로 같은 배양액을 교환하며 배양하였다. 세포가 배양 플라스크의 70-80% 자랐을 때 플라스크의 배양액을 제거하고 1 x PBS 1 mL씩 넣어 두 번 세척하였다. 1% formaldehyde 1 mL로 15분간 처리한 후 다시 formaldehyde를 제거하고 증류수로 3번 세척하였으며 Alizarin red solution 1 mL로 20-25분간 반응시키고 현미경으로 관찰하였다.

라. RT-PCR을 이용한 골형성 단백질의 발현

배양한 세포는 골아세포로의 분화 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 통하여 type I collagen, alkaline phosphatase, cbfa-I 및 osteocalcin의 mRNA 발현을 확인하였다. 세포가 배양 플라스크의 70-80% 자랐을 때 trypsin을 처리하여 세포를 분리한 다음 RNeasy Mini Kit(Quiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 dNTP, Oligo를 섞어 냉



**Fig. 1.** (Left) Buffy coat extracted from whole blood. (Right) Mononuclear cells (MNC) were layered in Ficoll-hypaque solution after centrifuge.

장 처리하였고 다시 RT buffer, MgCl<sub>2</sub>, DTT, RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor을 가하여 반응시켰으며 RTase와 RNase H를 넣어서 mRNA를 제거하였다. PCR(Polymerase chain reaction)은 95°C에서 10분, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 72°C에서 1분간 30회 반복하였으며 agarose-gel에서 전기영동을 실시하여 확인하였다.

### III. 결 과

#### 가. 말초혈액 단핵구층의 분리 및 배양

350 mL의 말초혈액에서 1.077 밀도의 Ficoll-Hypaque로 분리한 약  $1 \times 10^6$ 개의 단핵세포를 얻어 5-7일간의 배양을 통하여 부유하여 성장하는 세포들은 제거하고 배양 용기 바닥에 부착하여 성장하는 세포만을 선택적으로 지속 배양할 수 있었다. 배양 3-5일 세포는 군락을 형성하여 증식하는 양상을 나타내었으며 시간이 지남에 따라 둥근 형태의 단일 세포로 분리되고 점차 다각형을 띄우며 증식하였다. 세포는 *in vitro*에서 쉽게 확장되었으며 섬유모세포와 유사한 형태를 보였다(Fig. 2, Above). 배양 3-4주가 경과한 후 주사전자현미경으로 세포의 형태를 분석해 본 결과 핵이 매우 크고 긴 돌기

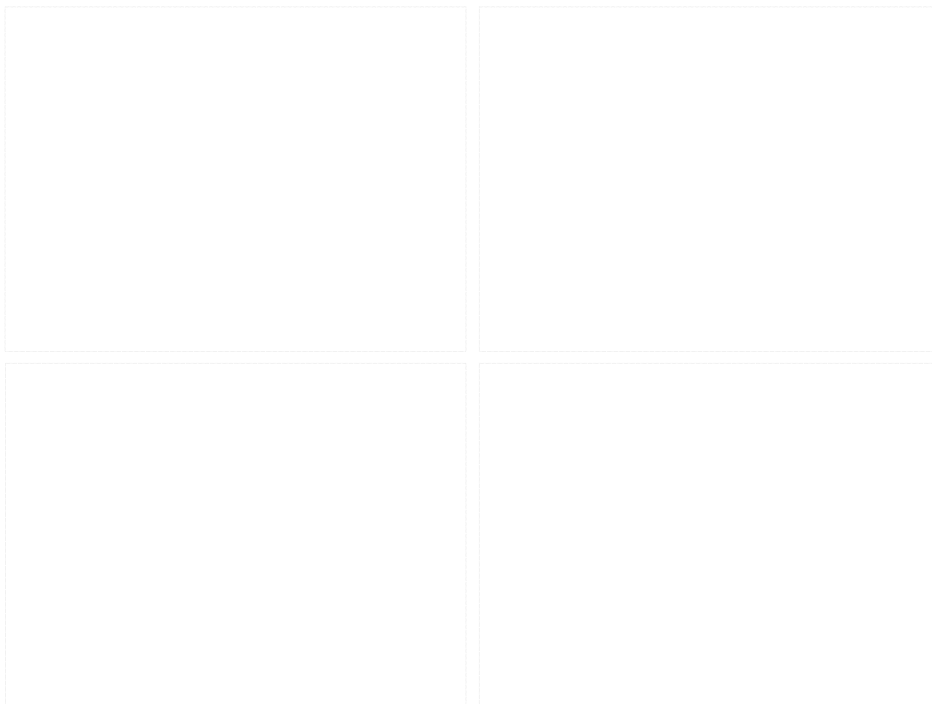
를 가지고 있으며 세포질 내에 미토콘드리아와 골지 복합체가 매우 풍부하게 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3, Left). 배양 7-8주가 경과하면 세포의 증식보다는 여러 세포들이 융합되어 거대다핵세포가 되는 양상을 나타내었다(Fig. 3, Right).

#### 나. 세포표면 항원의 분석

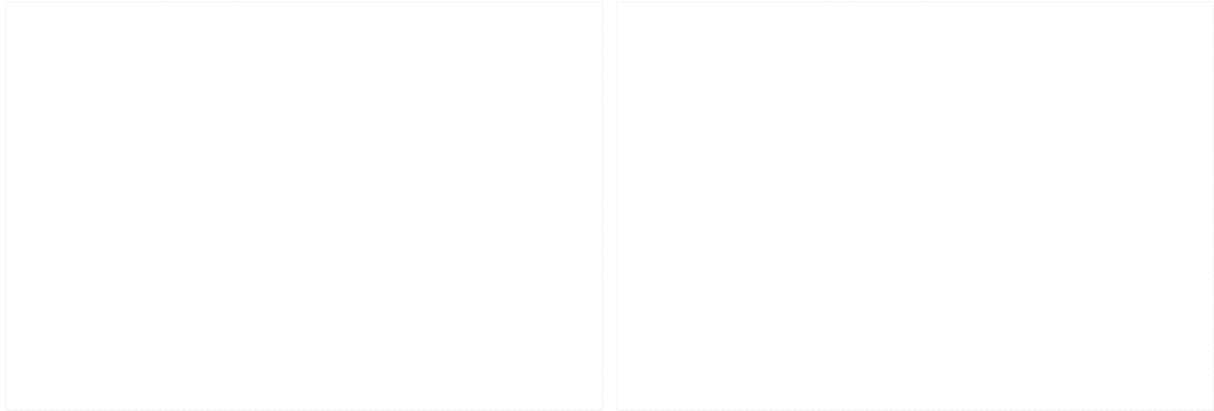
이들 세포의 표면항원의 발현을 배양 10일째 유세포 분석기를 이용하여 분석한 결과 이들 줄기세포에서 CD34는 음성으로 나타나고 단핵구 및 대식세포의 marker인 CD14의 발현이 관찰되어 이들 세포가 단핵구층에서 분화되어 나온 세포임을 알 수 있었다(Fig. 4).

#### 다. 배양세포의 골분화 유도

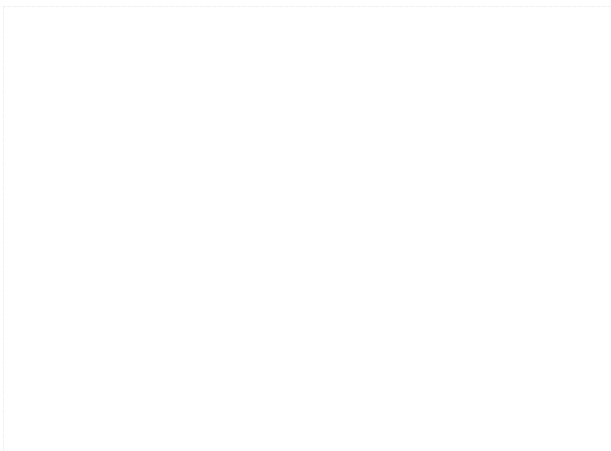
분리 배양되어 얻어진 전구세포들을 골세포로 분화 유도하였으며 ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate 및 dexamamethasom 첨가에 의하여 90% 이상에서 섬유아 세포 모양의 세포는 분화하여 다각형으로 변화하였고 결절을 형성하며 결절 주위로 세포들이 모이는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 3-4주에서 mineralized nodule이 형성되기 시작하여 8주 이상의 장기배양에서 무기질 침착이 풍부하게 관찰되었으며 alizarin red에 붉게 염색



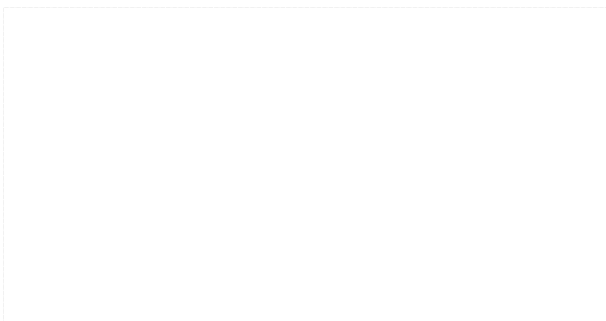
**Fig. 2.** (Above) Cellular morphology of the human peripheral blood stem cells. These cells gradually attached and adopted a fibroblastic morphology, reaching confluence on day 21. (Below) Peripheral blood stem cells grown in osteogenic medium demonstrate that cells were aggregated around the nodules and showed positive with alizarin red staining(original magnification,  $\times 200$ ).



**Fig. 3.** (Left) Transmission electron microscopy finding of peripheral blood stem cells. The cell has large nucleus, ruffled plasma membrane, multiple mitochondria and golgi-apparatus with long dendrite. (Right) A population of multinuclear giant cells was observed in 7-8 weeks in cultures.



**Fig. 4.** Blood mononuclear cells were analyzed by flow cytometry.



**Fig. 5.** Expression of osteogenic protein mRNA by RT-PCR.

되는 양성반응을 나타내었다(Fig. 2, Below). 세포는 RT-PCR을 통하여 골아세포의 성장 표지인자로서의 type I collagen, alkaline phosphatase, cbfa-I 및 osteocalcin 등

의 골형성 단백을 mRNA를 통해 확인한 결과 모두 발현했음을 알 수 있었다(Fig. 5).

IV. 고 찰

골이식술은 성형외과 영역에서 널리 시행되는 술식으로 골절 불유합의 치료, 골 결손의 치료 등에 시행되고 있으며 자가골이식술, 동종골이식술, 이종골이식술, 인공골이식술 등이 있다. 이 중 자가골이식술이 가장 좋은 결과를 보이는데 이는 자가골이 면역 반응을 일으키지 않으며 골아세포에 의한 골 형성 능력이 있기 때문이나 공여부에서 골을 채취하는 과정에서 여러 합병증이 발생할 수 있다는 단점이 있다. 반면에 동종골 및 이종골은 면역반응을 일으킬 수 있고 이식골의 흡수 및 불유합이 흔히 있으며 간염 및 에이즈 등의 바이러스성 질환이 전파될 수 있는 위험성이 있다. 따라서 자가골이식술, 동종골이식술, 이종골이식술 등을 대체할 수 있는 술식의 필요성이 대두되었으며 최근 줄기세포를 이용해서 조직을 재생시키는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>17</sup>

줄기세포란 자기 스스로 증식할 수 있는 능력과 특이 조직으로의 분화가능성이 있는 세포들을 총칭한다. 이런 줄기세포는 아직까지 그 특성이 명확히 정의되지 않아서 증식 능력과 특이조직으로 분화되는 것을 확인함으로써 증명할 수 있다. 줄기세포는 그 공급원에 따라서 배아줄기세포, 신생아줄기세포, 성인줄기세포 등으로 분류한다. 배아줄기세포는 신경세포, 조혈세포, 인슐린 분비세포 등 다양한 세포로의 분화 능력이 뛰어난데도 윤리적, 도덕적인 문제가 있으며 이식 시에 기형종과 같은 종양세포로의 형질 변환 가능성이 있다.<sup>8,9</sup> 기존

의 줄기세포 치료에 가장 널리 이용되고 있는 골수 줄기세포의 경우, 골수에서 이를 획득하기 위한 기술은 고통스럽고 마취가 필요해 골수줄기세포 치료의 보편화에 매우 큰 장애가 되고 있다.

이러한 제한점을 극복하기 위해 가장 널리 연구되고 있는 방법이 G-CSF와 같은 동원유도제를 이용하여, 골수의 줄기세포를 말초혈액으로 동원시킨 후 이용하는 치료법인데, 이 방법의 가장 큰 장점은 비침습적인 방법으로 줄기세포를 얻을 수 있다는 것이며, 반면 G-CSF 투여에 따른 잠재적인 부작용들로 염증세포도 함께 동원됨에 따라 염증의 악화, 혈소판과 혈구수의 증가와 혈액 내 점성 증가 등의 원인으로 인한 혈전의 유발들도 알려져 있다.<sup>10</sup> 본 실험에서는 일반적으로 알려져 있는 G-CSF 투여를 통한 골수 줄기세포의 동원을 유발하지 않고 건강한 성인으로부터 CD14에 양성을 나타내는 단핵구를 추출하여 이로부터 시험관 내에서 중간엽 전구세포를 분화시키는 방법을 사용하였다.<sup>5,6,11</sup> 골수나 말초혈액에서 주로 부유상태(non-adherent)로 있는 세포가 조혈모세포라면 부착성 세포들은 주로 중간엽 세포층을 구성하며, 이들은 골수의 기질세포(stroma)를 구성하는 세포로 잘 알려져 있으나 제대혈이나 지방조직에서도 발견된다.<sup>12,13</sup>

본 실험방법에서는 인체의 상지 정맥으로부터 뽑은 혈액을 Ficoll-hypaque 1.077 용액과 섞어 밀도구배원심분리법을 이용하여 혈구와 혈장을 제거하고 남은 단핵구들을 배양 용기에 넣고 배양한 뒤 적은 수의 배양 용기에 부착된 세포를 계속 계대배양함으로써 다른 종류의 세포를 제거하고 간엽 세포층을 얻을 수 있었는데, 광학 혹은 편광현미경 하에서 관찰하면 섬유아세포와 비슷한 모양의 균일한 세포 양상을 나타내었다. 세포 배양 중 세포수와 증식능의 차이는 혈액을 채취하는 방법, 채취한 혈액줄기세포의 양, 혈액을 제공한 공여자의 나이 및 건강 상태 등에 의해 좌우된다고 여겨지며 일반적으로 과도한 계대배양은 세포의 노화 및 세포사멸(apoptosis)을 유발하여 그의 성질을 소실하게 한다고 보고되고 있다.<sup>11-13</sup> 이들 세포는 배양 8주경에 이르러서는 세포의 증식보다는 여러 세포들이 융합되어 다핵세포가 되는 양상을 보여주었는데 이런 거대다핵세포(multinuclear giant cell)는 파골세포(osteoclast)의 특징적인 형태를 나타내며 일부 세포가 파골세포로 분화되었음을 알 수 있었다.<sup>6</sup> 본 연구에서 배양된 간엽 전구세포층의 골형성을 유도하기 위해 dexamethasone,  $\beta$ -glycerophosphate, ascorbic acid를 첨가하였으며, L-ascorbic acid는 비타민 C로서 collagen-linking에 관여하는 보조인자이며  $\beta$ -glycerophosphate는 무기질 침착

을 촉진하는 기능을 가지고 있다고 보고되고 있는데, dexamethasone의 경우는 지방 및 연골의 분화에도 어느 정도 관여를 하고 있는 것으로 나타나 다중분화능과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.<sup>7,8,11</sup>

최근 각종 조직에서 유래하는 줄기세포들을 이용하여 각종 장기의 세포를 재생하는 방식의 세포치료적 응용 이외에 이들 세포가 신체 면역계를 재구성할 수 있는 능력을 이용한 면역학적 응용이 중요한 세포치료적 적용대상이 되고 있다. 노화가 진행됨에 따라 수반되는 골다공증에 인한 골절이나 골절치유 시 감염으로 인한 불유합 골절 및 만성골질환의 근원적인 치료법으로 골세포의 이식을 생각할 수 있다. 그러나 여기에 동반하는 문제로서 면역학적인 거부반응이 있을 수 있는데, 줄기세포의 경우 구조조직합성항원 중 Class II가 발현되지 않고 이식 시 발생하는 면역반응의 정도가 미약할 것으로 생각되고 있으며, 공여자의 조직형과 일치하는 non-self 조직에 대해서는 self로 인지하게 하는 donor-specific tolerance가 발생하여 이식 시의 거부반응을 최소화 할 수 있음이 알려져 있다.<sup>4,10,14,15</sup> 또한, 말초혈액에서 유래된 단핵구 계열의 전구세포는 현재 알려진 가장 강력한 면역세포인 수지상세포로 분화시킬 수 있어 이를 통하여 면역관용을 유도하는 연구가 비약적인 발전을 할 것으로 기대한다.

## V. 결 론

본 연구는 건강한 성인의 말초 혈액으로부터 추출한 단핵구층으로부터 간엽전구세포를 분리, 배양하고 골분화 유도배지를 통하여 골형성능력을 알아보았다. 이들 세포들은 배양 과정에서 섬유모세포와 같은 형태를 가지고 분열 및 증식하는 양상을 나타내었고, 배양 10일째 유세포 분석기를 이용하여 분석한 결과 CD14의 발현이 관찰되었으며, ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate 및 dexamethasone의 첨가에 의하여 골형성이 유도되었고, RT-PCR반응을 통하여 type I collagen, alkaline phosphatase, cbfa-I 및 osteocalcin 등의 골형성 단백질 발현했음을 알 수 있었다.

## REFERENCES

1. Jung EJ, Yoon TR, Song EK, Kim SH: *In vitro* and *in vivo* osteogenic induction of mesenchymal stem cells from rabbit bone marrow. *J Korean Orthop Res Soc* 4: 79, 2001
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult

- human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143, 1999
3. Oh IH, Kim DW: Three-dimensional approach to stem cell therapy. *J Korean Med Sci* 17: 151, 2002
  4. Bonde J, Hess DA, Nolte JA: Recent advances in hematopoietic stem cell biology. *Curr Opin Hematol* 11: 392, 2004
  5. Zhao Y, Glesne D, Huberman E: A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2426, 2003
  6. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2: 477, 2000
  7. Hong SJ, Lee EA, Chae GT, Han H: Differentiation of osteoblast progenitor cells from human umbilical cord blood. *Immune Netw* 2: 166, 2002
  8. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS: Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 26: 5158, 2005
  9. Spangrude GJ: When is a stem cell really a stem cell? *Bone Marrow Transplant* 32: S7, 2003
  10. Ogawa BM: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844, 1993
  11. Chim H, Schantz JT: Human circulating peripheral blood mononuclear cells for calvarial bone tissue engineering. *Plast Reconstr Surg* 117: 468, 2006
  12. Fernández M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ: Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 20: 265, 1997
  13. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM: Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 106: 1199, 2002
  14. Kim SJ, Kim KH, Jung JS, Choi OH: Study on the Culture and *in vivo* transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Korean J Obstet Gynecol* 48: 1402, 2005
  15. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S: Circulation skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153: 1133, 2001