

미니돼지에서 자가 피부유래 전구세포와 탈회골 및 피브린 스캐폴드를 이용한 하악골 골결손부의 골재생에 대한 연구

변준호¹ · 최문정¹ · 최영진¹ · 심경목¹ · 김옥규² · 김종렬² · 박봉욱¹

¹경상대학교 의학전문대학원 치과학교실 구강악안면외과, 경상대학교 건강과학연구원,

²부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Abstract

MANDIBULAR BONE REGENERATION USING AUTOGENOUS SKIN-DERIVED PRECURSOR CELLS WITH A MIXED DEMINERALIZED BONE AND FIBRIN GLUE SCAFFOLD IN MINIATURE PIGS

June-Ho Byun¹, Mun-Jeong Choi¹, Young-Jin Choi¹, Kyoung-Mok Shim¹,
Uk-Kyu Kim², Jong-Ryoul Kim², Bong-Wook Park¹

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

²Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University

Purpose: The aims of this study were to assess the *in vitro* co-culturing pattern of isolated skin-derived precursor cells (SKPs) with a mixed demineralized bone (DMB) and fibrin glue scaffold and to evaluate *in vivo* osteogenesis after transplantation of autogenous SKPs with a these mixed scaffold in the animal's mandibular defects.

Materials and Methods: We isolated SKPs from the ears of adult 4 miniature pigs. The isolated SKPs were co-cultured with a mixed DMB and fibrin glue scaffold in a non-osteogenic medium for 1, 2, and 4 weeks. Histological characteristics of *in vitro* co-cultured cells and scaffold were evaluated. 1×10^7 cells/100 μ l of autogenous porcine SKPs were grafted into the mandibular defects with a DMB and fibrin glue scaffold. In the control sites, only a scaffold was grafted, without SKPs. After two animals each were euthanized at 2 and 4 weeks after grafting, the *in vivo* osteogenesis was evaluated with histomorphometric and osteocalcin immunohistochemical studies.

Results: Homogeneously shaped skin-derived cells were isolated from porcine ear skin after 3 or 4 weeks of primary culture. *In vitro* osteogenic differentiation of SKPs was observed after co-culturing with a DMB and fibrin glue scaffold in a non-osteogenic medium. Von Kossa-positive bone minerals were also noted in the co-cultured medium at 4 weeks. As the culture time progressed, the number of observable cells increased. Trabecular new bone formation and osteocalcin expression were more pronounced in the SKP-grafted group compared to the control group.

Conclusion: These findings suggest that autogenous SKP grafting with a DMB and fibrin glue scaffold can serve as a useful alternative to bone grafting technique.

Key words: Skin-derived precursor cells, *In vitro* osteogenesis, *In vivo* osteogenesis, Mandibular bone regeneration.

*This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (KRF-2007-331-E00236).

I. 서 론

결손된 골조직을 회복하기 위한 다양한 방법들이 소개되어 왔으며, 이 중 큰 골 결손부를 회복하기 위한 방법으로는 골이식술과 골신장술이 대표적이다. 골신장술은 근래에 활발히 연구 되어졌으며^{1,2)}, 다양한 부위에서 다양한 방법으로 부족한 골을 형성할 수 있는 방법으로 최근에 들어서는 치과적 영역에서 치조골 형성을 위한 방법으로도 활용도가 높다. 하지만, 골신장술은 장기적인 장치물 착용에 따른 환자의 불편감 증가와 골재생 양이나 모양을 조절하기 힘든 단점이 있다. 골이식술은 예전부터 널리 시행되어오던 방법으로, 만들어진 골의 질적인 면에서는 자가골 이식술이 단연 각광을 받았지만, 이는 공여부 채취에 따른 이차적 수술의 필요성과 이로 인한 합병증 발생 가능성 및 이식골의 양이 제한적인 큰 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 공여부 수술이 필요 없는 동종골 및 이종골 등의 합성골이 개발되고 임상에 사용되고 있지만, 이들은 이식에 따른 면역반응이나 생성된 골의 질이 좋지 못한 큰 단점들을 안고 있다.

이에 최근에는 조직공학적인 방법을 이용하여 결손된 골을 재생하는 방법에 대한 연구들이 활발히 이루어지고 있으며, 이러한 조직공학적인 골은 적절한 스캐폴드만 선택된다면 필요한 양과 모양에 제한 받지 않고 골을 형성할 수 있는 큰 장점이 있으며, 특히 자가조직을 이용한 조직공학적인 골은 면역반응을 해결할 수 있고, 종교 및 윤리적 문제에 제한을 받지 않기에 미래의 조직재생을 위하여 활발히 연구되어야 할 분야이다^{3,4)}. 이러한 조직공학을 이용한 재생의학을 위해서는 다양한 줄기세포 또는 미분화 전구세포가 필수적이며, 최근의 연구들은 주로 성체(adult) 줄기세포를 이용하고 있다⁴⁾. 성체 줄기세포는 골수(bone marrow), 췌장(pancreas), 지방(fat), 근육(muscle), 혈액(circulating blood), 제대혈(umbilical cord blood), 골막(perosteum), 모낭(hair follicle) 및 피부(skin) 등의 다양한 조직에서 추출과 배양에 성공 하였다⁵⁻⁵⁾. 하지만, 향후 임상적 용을 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 연구되어진 분야이지만, 피부가 인체에서 가장 넓은 부위에 걸쳐 있고, 특별한 공여부 합병증 없이 쉽게 채취할 수 있으며, 면역반응에 제한을 거의 받지 않는 자가 줄기세포의 가장 강력한 공여부라는 점에서 최근에 각광받고 있다⁶⁾. Toma 등⁷⁾은 설치류의 피부에서 처음으로 줄기세포를 추출하여 이를 피부유래 전구세포(skin-derived precursor cells, SKPs)라 명명하였으며, 그 후 돼지 태아 피부⁸⁾ 및 인간의 피부에서⁹⁻¹¹⁾도 줄기세포의 추출 및 배양에 성공하였고, 이외에도 피부유래 전구세포를 이용한 *in vitro* 상에서

의 골형성⁹⁾ 및 *in vitro* 상의 말초신경재생에 대한 연구¹²⁾ 등이 진행되었다. 최근에는, 피부유래 전구세포에서 발견되는 다능성(pluripotency)유지 유전자들에 대한 연구 뿐 아니라^{13,14)}, 피부유래 전구세포와 신경세포 사이의 유사성 등에 대해 활발히 연구되고 있다. 많은 연구에서 피부유래 전구세포가 신경능선(neural crest)에서 기원한 세포들과 유사한 특징들을 나타냄을 관찰하였고, 피부조직에서 신경능선유래 줄기세포(neural crest stem cells)의 추출이 또한 보고되기도 하였다¹⁵⁻¹⁷⁾. 이는 피부유래 전구세포가 신경능선세포와 같은 기원으로, 이를 이용한다면 신경세포 재생에 큰 장점을 가지고 있다는 의미이다. 하지만, 이러한 피부유래 전구세포의 신경특성에 대한 활발한 연구에 비해 골세포 및 골조직 형성에 대한 연구는 아직까지 미비한 상태라 할 수 있다.

본 연구자들은 선행된 연구에서 미니돼지의 이부피부(porcine ear skin)를 약 3-4주 동안 배양하여 균일한 모양의 피부유래세포를 추출하였으며, 이들 추출된 피부유래세포에서 전사인자인 Oct-4, Nanog, 그리고 Sox-2의 발현을 관찰함으로써 이들 세포들이 다능성(pluripotency)을 가진 원시적인 전구세포(primitive precursor cells)임을 관찰하였다³⁾. 또한, 이들 피부유래세포를 골세포, 지방세포, 그리고 신경세포로의 유도분화가 모두 성공적으로 일어남을 관찰하였으며, 이러한 결과는 이들 피부유래 전구세포가 다배엽 세포로 분화(multilineage differentiation)할 수 있는 능력을 갖추고 있다는 의미였다³⁾. 본 연구에서는 이러한 선행된 연구를 바탕으로 미니돼지의 이부 피부에서 분리 추출한 피부유래 전구세포와 탈회골(demineralized bone, DMB) 및 fibrin glue 혼합 스캐폴드와의 반응을 관찰하기 위하여 *in vitro* 상에서 약 4주간 혼합 스캐폴드와 피부유래 전구세포를 공동배양(co-culture)하여 세포 성장양태를 관찰 하였으며, 또한 자가 피부유래 전구세포의 생체내 골형성(*in vivo* osteogenesis) 정도를 관찰하기 위하여 4두의 미니돼지 하악골에 골 결손부를 형성한 후 자가피부유래 전구세포와 DMB 및 fibrin glue 스캐폴드를 이식하여 2주 및 4주 후 각각의 골형성 정도를 관찰하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 실험동물 및 피부유래 전구세포의 추출

본 실험에 사용한 동물모델은 선행된 연구와 동일한 것으로 체중 25 kg 내외의 생후 6개월에서 1년 사이의 미니돼지 4 두를 이용하며³⁾, 모든 실험연구는 경상대학교 동물실험 윤리기준을 준수하면서 이루어 졌다. 실험동물에서 SKPs를 추출하는 과정도 선행된 연구에서 소개한 방법과 동일한 방법으로³⁾, 간략히 요약하면, 실험동물을 전신마취

후 한쪽 이침부를 절제하였고, 채취한 이침부 조직을 세척 후 표피(epidermis) 및 진피(dermis)와 모낭, 피지샘 및 땀샘 등이 포함된 진층의 피부를 분리하였다. 분리된 진층 피부를 약 1-2 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)을 첨가한 2 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12 (Invitrogen) 배지가 함유된 조직배양판 (tissue culture plates, Nunc, Denmark)에 넣고 38.5°C, 5 % CO₂와 humidity 조건에서 조직배양하였다. 일차배양 2일 후 피부조직에서 탈락된 세포가 배지에 부착된 것을 확인하고 남은 조직절편은 forceps으로 제거하였다. 이시기에는 배지를 하루에 한번씩 교체하였고, 피부절편을 제거한 후에는 1주에 2번씩 배지를 교체하였으며, confluent cells은 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Invitrogen)으로 처리 후 계대배양(subculture) 하였다.

2. *In vitro* 상에서 DMB 및 fibrin glue 혼합 스케폴드와 SKPs의 공동배양

7×10⁵의 SKPs를 0.3 ml의 fibrin glue (Greenplast[®] kit, Green Cross, Korea)와 0.25 cc의 DMB (Grafton[®], Osteotech[™], NJ, USA)를 주입하여 배양판에서 38.5 °C, 5 % CO₂와 humidity 조건에서 조직배양 하였고, 1주에 2번씩 배지를 교체하였다(Fig. 2. A). 배양시작 1, 2, 4 주 후 각각 배양된 스케폴드와 세포를 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Invitrogen, MD, USA)에 세척한 후 3.7% (w/v) formaldehyde액에 고정하였다. 이후 paraffin에 함입 후 조직학적 평가를 위해 블록을 제작한 후 4 µm 절편으로 절단 후 glass slide에 놓고 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 hematoxylin and eosin 염색을 실시하였다. 4주간 배양한 세포와 스케폴드에서 *in vitro* 상의 골화정도를 평가하기 위해 von Kossa 염색을 실시 하였다. 이의 간략한 과정은 배양세포와 스케폴드를 PBS로 세척하고 4% 중화 formaldehyde에 30분간 실온에서 고정하였고, 증류수로 세척 후 5% 질산은용액(silver nitrate solution) (Sigma)을 처리한 후 암실에서 1시간 유지하였다. 이 후 증류수로 과잉의 질산은용액을 제거하고, sodium carbonate/formaldehyde solution을 수 분 동안 처리하여 색을 발현시켰으며, 잔류 질산은은 5% sodium thiosulfate로 중화시켰다.

3. 미니돼지에서 자가피부유래 전구세포를 이용한 하악골 골결손부의 골재생 및 이의 조직학적 평가

이부의 피부 채취 후 실험실에서 약 4주간 배양하여 자가 피부유래 전구세포를 형성한 4두의 미니돼지에서 azaperone과 tiletamine-zolazepam을 이용하여 같은 방법으로 진정과 전신마취 후 구강내 접근법으로 하악골 골체부를 노출시켰다. 외과용 bur을 이용하여 노출된 골체부에 가로 1.5 cm, 세로 1.5 cm, 깊이 1 cm (1.5 × 1.5 × 1 cm) 정도의 골결손부를 두개 형성한다 (Fig. 4. A). 하나의 골결손부에는 1×10⁷ cells/ 100 µl의 자가피부유래 전구세포 (Fig. 4. B)와 DMB (Grafton[®], Osteotech, NJ, USA) 0.25 cc 및 fibrin glue (Greenplast[®], Greencross, Korea) 0.3 ml를 혼합한 스케폴드와 같이 이식한다. 나머지 하나의 골결손부는 피부유래 전구세포 없이 DMB와 fibrin glue 스케폴드만 혼합하여 이식하였다(Fig. 4. C). 이 후 이식된 골결손부에는 흡수성 차단막인 bovine collagen dura mater (Lyoplast[®], Aesculap, Germany)로 덮고 일차 봉합하였다(Fig. 4. D). 2 mg/kg의 소염진통제 (Meloxicam[®], Boehringer Ingerlheim, Germany)를 12 시간 간격으로 1일 간 근육주사로 투여 하였으며, 1세대 항생제(Cefazolin[®], Yuhan Corp., Korea)을 12시간 간격으로 술후 5일간 근육주사로 투여 하였다.

이식 수술 2주와 4주 후 각각 2두의 실험동물을 전신마취 후 혈관내로 KCl을 주입하여 희생하였으며, 희생 후 이식 실험한 하악골을 *en bloc*으로 절제하였고, 10% 중성 포르말린에 24시간 고정 후 5% 질산에 약 3일간 탈회하였다. 이 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하였고, 4 µm 두께로 절편을 만들었고, 이는 염색과정 동안 조직탈락을 최소화하기 위하여 silane을 코팅한 슬라이드글라스에 부착하였다. 일반적인 골형성 정도를 관찰하기 위해 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였고, 이식편에서 골형성 단백질 중 하나인 osteocalcin의 발현을 관찰하기 위해 면역조직화학염색을 실시 하였다. 면역조직화학염색은 4 µm 두께의 절편이 부착한 슬라이드글라스를 실온에서 12시간 보관한 후 탈파라핀과 함수 과정을 거쳤다. 슬라이드글라스를 Tris-EDTA buffer (LabVision)에 담구어 PTmodule[™] (Labvision) 내에서 100°C에서 25분간 반응시켜서 탈파라핀과 전처리를 동시에 시행한 후 TBS (Tris Buffered Salline, LabVision)액에 3분간 2회 세척하였다. 내인성 peroxidase를 차단하기 위해 과산화수소수(hydrogen peroxide)를 실온에서 10분간 반응시킨 후 TBS에 3분간 2회 세척 하였다. Osteocalcin에 대한 일차항체는 1:200으로 희석한 mouse monoclonal anti-osteocalcin (Abcam, UK)를 사용 하였으며, 면역염색은 자동면역염색기(Lab Vision Autostainer[™], Lab Vision, CA, USA)를 사용하

여 37°C에서 32분간 일차항체를 반응 시켰으며, 이 후 슬라이드글라스를 biotin을 부착한 이차항체인 biotinylated polyvalent secondary antibody 용액으로 처리하였다. 이 후 horseradish peroxidase-conjugated avidin-biotin complex로 반응시킨 후 3,3-diaminobenzidine과 hydrogen peroxide를 사용하여 발색하였으며, hematoxylin으로 핵을 대조염색 하였다.

Osteocalcin에 대한 면역조직화학 염색의 평가는 광학 현미경하에서 실험에 대한 사전 지식이 없는 두 명의 병리학자에 의해서 실시 되었다. 대조군 및 실험군에서 최소 3개 이상의 조직표본을 제작하였고, 신생골조직의 주변을 감싸는 골모세포(osteoblast) 및 신생골조직 내부에 위치한 골세포(osteocyte)에서 각각 면역염색의 발현을 조사하였다. 선행된 연구들^{1,2)}에서와 같이 면역염색의 발현 강도는 +++, ++, +, 그리고 - 등급을 나누어 강, 중, 약, 그리고 음성으로 각각 구분하였다. 발현이 의심스러울 때는 +/- 로 표시 하였다.

III. 연구결과

1. 피부유래 전구세포의 추출과 동물실험

선행된 연구의 결과와 같이 미니돼지 이부 피부조직을 배양한지 약 3-4 주 정도에 균일한 모양의 이식 가능한 양의 피부유래 전구세포(SKPs)를 얻을 수 있었다(Fig.1). 또한, 모든 실험동물에서도 하악골 결손부내 이식 수술 후 감염이나 심각한 부종 등의 특이소견의 관찰 없이 희생시점까지 잘 유지 되었다.

2. *In vitro* 상에서 DMB 및 fibrin glue 혼합 스캐폴드와 SKPs의 공동배양

DMB 및 fibrin glue 혼합 스캐폴드와 SKPs를 공동 배양하는 전 과정 동안 동글고 균일한 모양의 세포들이 관찰 되었다. 배양되는 세포 수는 배양시간이 늘어날수록 증가하였다(Fig. 2. B & C). 2주간 배양 후 스캐폴드 주변의 배양되는 세포내에서 갈색의 골기질들이 관찰 되었고(Fig. 2. C), 4주 동안 배양된 판을 von Kossa 염색하였을 경우 흑색으로 관찰되는 골기질들을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2. D).

스캐폴드와 SKPs를 공동배양한지 각각 1주, 2주, 그리고 4주 후에 배양된 기질의 조직소견을 관찰할 때, 모든 시간에서 잘 보존되고 생존된 세포들을 DMB와 fibrin 기질 사이에서 관찰 할 수 있었고, 관찰되는 세포 수도 시간이 증가함에 따라 약간 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3).



Fig. 1. Isolation and cultivation of skin-derived precursor cells from the ear skin of miniature pigs. A & B, After 7 days of primary culture (passage 0, x 40). Irregular and heterogeneous shaping of skin-derived cells was observed in this primary culture period. C, After 3 weeks of culture, homogeneous skin-derived cells were proliferated in the culture plate (x 40).

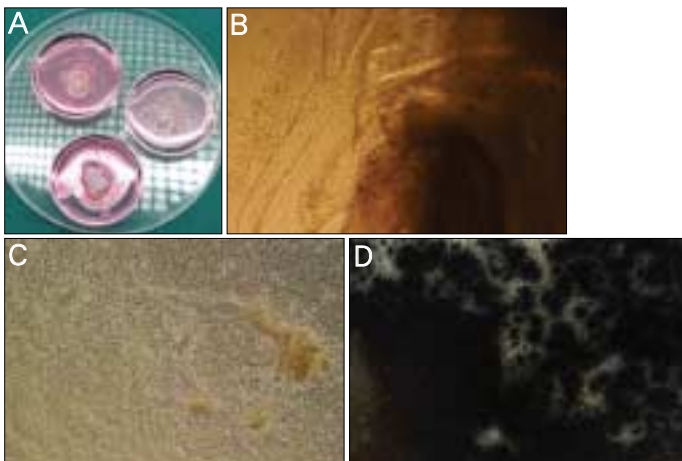


Fig. 2. *In vitro* co-culture of skin-derived precursor cells (SKPs) with a mixed DMB and fibrin glue scaffold in non-osteogenic inductive media. A, Immediately after primary co-culture of SKPs with a mixed scaffold in DMEM-F12. B, Round and homogeneous SKPs were observed in the mixed scaffold at 1 week after cell seeding (x 40 magnification). C, Dark brown matrix formation (arrow) and an increased number of cultivated cells were observed at 2 weeks after co-culture (x 40). D, Enhanced positive von Kossa staining was detected at 4 weeks after *in vitro* co-culture (x 40).

3. 미니돼지에서 자가피부유래 전구세포를 이용한 하악골 골결손부의 골재생

하악골 골결손부에 이식술 시행 2주 후, 피부유래 전구세포 없이 DMB와 fibrin 스펙트럼만 이식한 대조군에서는 골막에 의한 신생골 형성외에 이식편에 의한 신생골 형성은 거의 관찰되지 않았다. 이시기 대조군에서는 osteocalcin의 발현도 거의 관찰되지 않았다(Fig. 5. A & B). 하지만, 같은 시기 자가피부유래 전구세포를 이식한 군에서는 대조군 보다 상당히 증가된 신생 골소주를 관찰 할 수 있었고(Fig. 5. C), osteocalcin의 발현도 신생골소주 주변의 골모세포와 골소주 내의 골세포 등에서 중증도 이상으로 발현을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5. D & E). 이 시기 이식편 내에서도 이식된 DMB들이 관찰되고 이 주변에 osteocalcin

에 양성반응으로 관찰되는 신생골 형성반응을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5. F).

이식술 시행 4주 후, 대조군의 조직에서는 이식술 2주 후보다 신생 골소주의 형성이 증가되어 관찰 되었으며, 이 시기 대조군 조직에서의 osteocalcin은 신생골 주변의 골모세포에서 약하게 발현되었다(Fig. 6. A & B). 자가 피부유래 전구세포를 이식한 4주 후에는 2주 후 보다 증가된 신생골 형성을 관찰 할 수 있었고, 신생 골소주도 2주 후의 것보다 치밀해지고, 두꺼워져 관찰 되었다(Fig. 6. C & D). 또한, 이 시기 실험군 조직에서의 osteocalcin은 신생골 주변의 골모세포에서는 비교적 강하게 발현되고, 골세포에서는 약하게 발현되는 것이 관찰되었다(Fig. 6. E). 이식술 2주 및 4주 후 신생골 주변의 골모세포 및 신생골 내부의 골세포에서 osteocalcin의 발현정도는 Table 1에 나타나 있다.

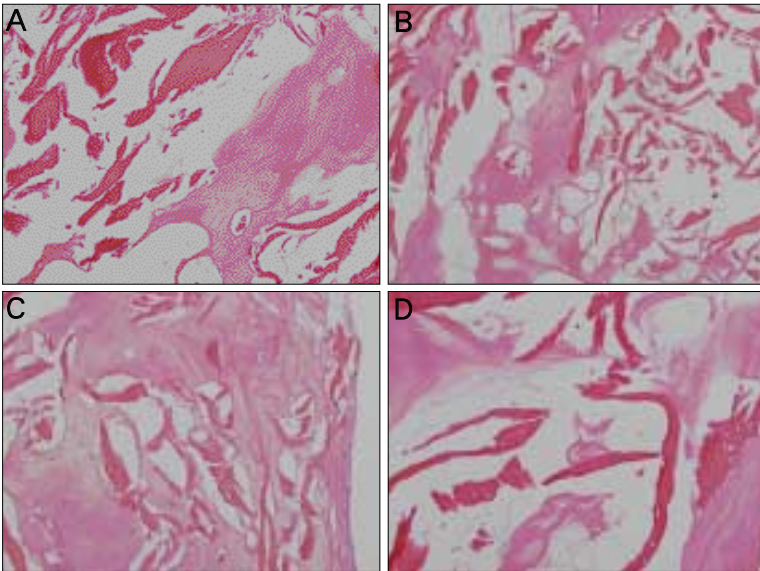


Fig. 3. The specimens of *in vitro* co-cultured SKPs with a DMB and fibrin glue scaffold. A, One week later of co-culturing. Culturing cells were visualized in the mixed scaffold (x 100). B, Two weeks later of co-culturing. Slightly increased visualized cell number was detected compared with one week specimen (x100). C & D, Four weeks later of co-culturing. Well-preserved round and homogeneous cells were observed in the mixed scaffold and the visualized cell number increased as time passed (C, x 100; D, x 200).

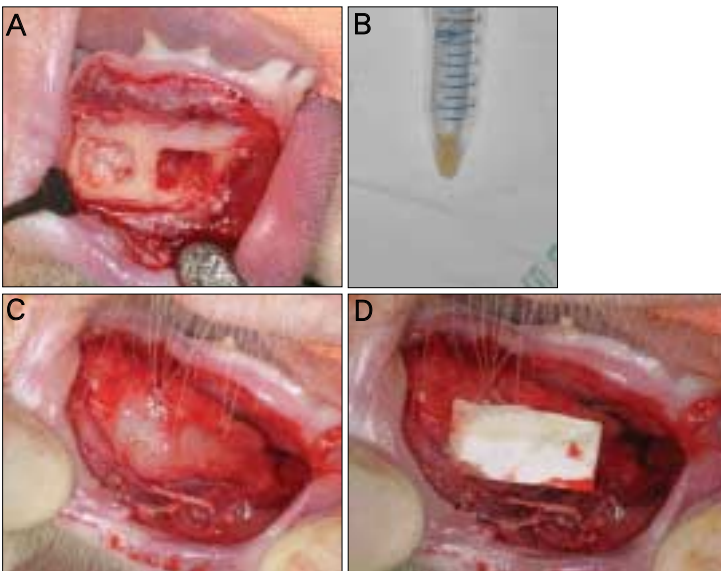


Fig. 4. Bone regeneration using autogenous SKPs in the porcine mandibular defect. A, Square shaped bony defects were made in the mandibular body. B, Photograph of SKPs at immediately before *in vivo* graft. C, Autogenous SKPs were grafted with demineralized bone and fibrin scaffold in one side of defect. The other defect was filled with only demineralized bone and fibrin scaffold. D, Resorbable bovine collagen dura mater (Lyoplant® Aesculap, Germany) was covered on the grafted defects.

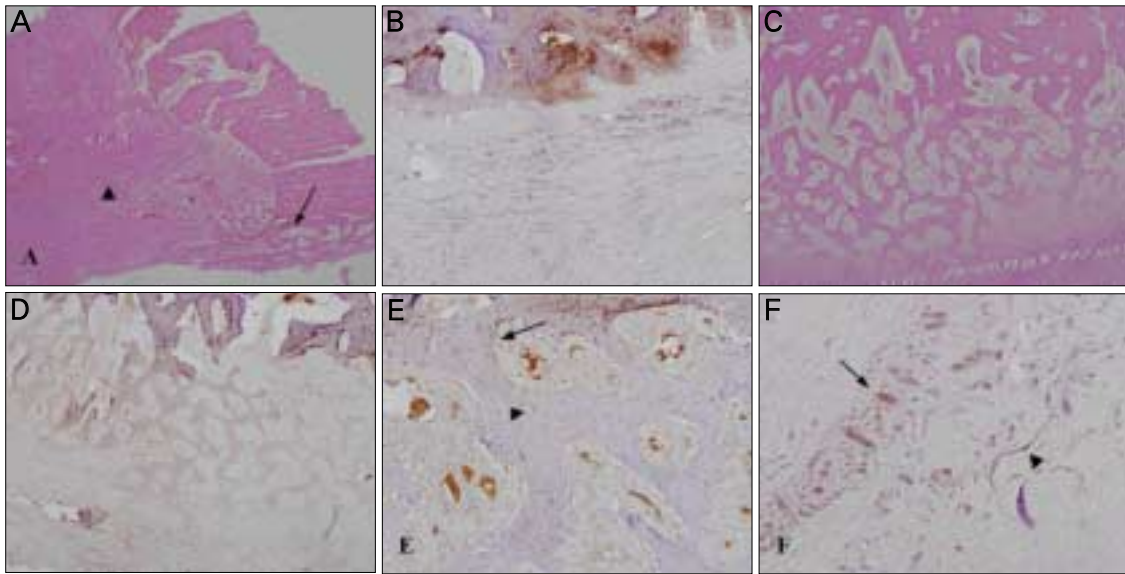


Fig. 5. Histological views at two weeks after graft. (A & B) Control specimen. A, Newly-generated trabecular bones were weakly observed under the periosteum (arrow). However, it was rarely observed in the grafted defect (arrowhead) (x 12 magnification). B, Osteocalcin was not detected in grafted tissues in control specimen (x 100 magnification). C, In autogenous SKPs grafted group, abundant newly-generated trabecular bones were observed from underlying basal bone (arrow) (x 40 magnification). D & E, Osteocalcin was detected in osteoblasts (arrow) lining the trabecular bone and osteocytes (arrowhead) in the new bone (C: x 40 and D: x 200 magnifications). E, Osteocalcin positive new-bone generative activity (arrow) was detected around the grafted demineralized bones (arrowhead) in the autogenous SKPs grafted group (x 100 magnifications).

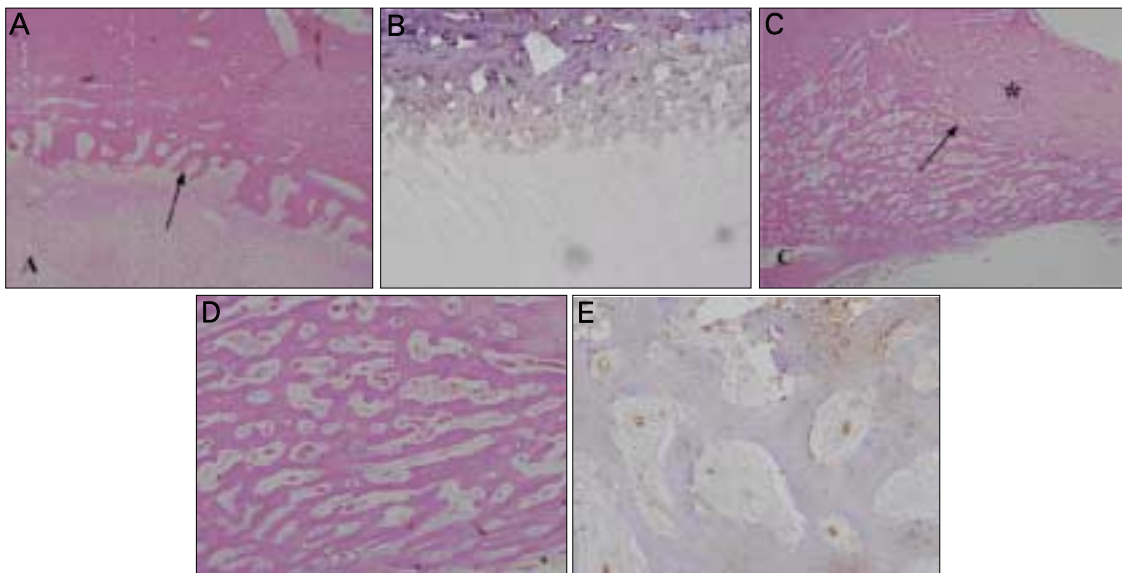


Fig. 6. Histologic appearances at four weeks after graft. (A & B) Control specimen. A, Slightly increased new bone generation (arrow) and osteocalcin activity were observed compared with control group of 2 weeks after graft (A and B; x 40 magnifications). (C & D) Newly-generated trabecular bones were more enhanced and matured than the specimen of 2 weeks after graft (C: *, basal bone; arrow, borderline of basal bone and new bone) (C: x 40 and D: x 100 magnifications). E, In this period, osteocalcin was also detected in matured osteogenic cells (x 200 magnification).

Table 1. Semi-quantitative analysis of osteocalcin staining in cellular components of the newly-generated bones in mandibular defects.

	Control group		Experimental group	
	Osteoblasts	Osteocytes	Osteoblasts	Osteocytes
2 weeks later	-	-	+++	++
4 weeks later	+	+/-	+++	+

Ⅳ. 고 찰

안면부에는 외상, 종양, 기형 등으로 악골이 결손된 증례가 증가하고 있고, 또한 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 이식술은 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⁾. 골신장술 또한 신생골의 형태와 양을 조절하기 힘들고, 골신장기를 장착하는 장기간 동안 환자의 불편감이 잔존하는 단점이 있다. 따라서, 조직공학을 이용한 악골재생술은 현시점에서 가장 진보된 치료방법으로 볼 수 있으며, 특히 자가조직을 이용한 조직공학적 골재생은 자가골 이식술의 공여부 채취에 따른 합병증을 줄일 수 있고, 동종골 및 합성골 사용에 따른 면역거부반응 및 생착실패 등의 문제를 해결 할 수 있는 새로운 대안으로 주목 받고 있다.

지금까지 조직공학을 이용하여 악골 재생술을 시도한 연구들 대부분은 골수유래 줄기세포^{20,21)}, 골막유래 세포²²⁻²⁴⁾, 그리고 자가골유래 세포^{25,26)} 등을 주요 기원으로 하여 이루어져 왔다. 하지만, 골수나 자가골을 채취하는 것도 침습적인 과정으로, 이에 따른 환자의 불안 증가와 혈종 및 감염 등이 야기 될 수 있다. 이에 비해 골막은 비교적 쉽게 접근 가능 하면서 조직공학을 이용한 골형성에는 아주 좋은 기원(source)이 될 수 있으나, 채취 가능한 부위와 양이 제한적이고, 다양한 다른 배엽의 조직으로 분화가 가능한지는 아직 연구되지 않았다. 이에 비해 피부는 전술한 바와 같이 인체의 가장 넓은 부위를 구성하기에 소량의 피부조직은 합병증 없이 채취 가능하고, 또한 피부내에는 다양한 줄기세포들이 존재함이 밝혀졌다⁶⁾. 최근의 연구들에서 이러한 피부유래 전구세포에 대한 다양한 연구가 증가하고 있으며, 특히, 이의 다능성(pluripotency) 및 다배엽 세포로의 분화능 등의 몇 가지 특징들이 규명되었다^{10,11,13,14)}.

전술한 바와 같이 다능성 피부유래 전구세포가 신경능세포와 많은 점에서 유사하고, 또 다양한 신경능표시유전자(neural crest marker genes)들이 이들 세포들에서 발현됨이 보고 되는 등^{13,15-17)}, 피부유래 전구세포와 신경세포와의 특성 연구는 최근에 비교적 활발한 데 비해, 피부유래 전구세포를 이용한 골형성에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 피부유래 세포에서 골세포의 분화는 일종의 전구세포의 탈분화(transdifferentiation) 능력을 이용하는 것으로, 이

는 외배엽성 조직인 피부가 원래 배엽의 기능과 특징적인 세포 표시자를 잃고 다른 배엽인 중배엽성 조직인 골세포로 전환 하는 것을 의미한다⁴⁾. 성체 줄기세포의 이러한 탈분화 능력 때문에 줄기세포의 유연성(plasticity) 개념과 분화된 세포가 줄기세포로의 재분화(redifferentiation) 등에 대한 개념들이 성립 되게 되었다^{4,6)}.

조직공학적 골형성에서 줄기세포 또는 전구세포의 골화세포 유도과 생체(*in vivo*)상의 이식을 위해서는 적절한 스케폴드 선택이 또한 중요한 요인 중 하나이다. 많은 연구에서 상업적 생체흡수성 스케폴드의 사용으로 조직공학적 골형성에 양호한 결과를 보고하였지만^{18,23,27)}, fibrin glue 또한 이식되는 줄기세포의 초기 안정성을 향상시켜 생체내 줄기세포의 이식에 훌륭한 스케폴드로 이용될 수 있다고 발표되었다²⁷⁻²⁹⁾. 또한, 자가 fibrin 스케폴드로 간주되는 혈소판풍부혈장(platelet-rich plasma, PRP)도 조직공학적 골형성에 많이 사용되어져 왔는데³⁰⁻³²⁾, 최근의 연구들에서 PRP의 골유도(osteinduction) 능력에 의문이 제기되었고, PRP 자체의 골형성 능력이 전무하다는 연구 결과도 발표되었다³²⁻³⁴⁾. 하지만, 자가 fibrin 스케폴드인 PRP나 제품으로 제조된 fibrin glue 모두 줄기세포의 생체내 이식시 이식세포에 대한 독성이 없고, 이식되는 세포의 유출을 막으면서 초기 안정화를 이루는 일종의 세포배송시스템(cell delivery system)으로서의 장점은 증명되었다^{21,27,28,31)}. 또한, 선행된 연구들에서 fibrin glue는 조직공학적 골형성을 위해 DMB²⁹⁾, β -tricalcium phosphate²⁸⁾, 그리고 biosorbable materials²⁷⁾ 등과 같이 사용되었는데, 이들은 모두 스케폴드의 물리적 강도를 증가시키는 역할을 하였다. 본 연구에서의 스케폴드 조합에서도, fibrin glue는 이식되는 세포의 초기 안정성에 기여하고, DMB는 이식조직의 물성을 향상시키는 데 도움이 될 것으로 기대하였다.

이러한 스케폴드에 대한 가설을 증명하기 위하여 본 연구에서는 DMB와 fibrin glue 혼합 스케폴드와 실험동물의 이부에서 추출한 SKPs를 공동 배양하였으며, 약 4주간의 배양기간 동안 세포가 잘 생존해 있으면서 그 수가 증가함을 관찰 하였다. 또한, 공동 배양한 배지가 골화유도배지가 아님에도 불구하고, 배양 2주 후부터 갈색의 골기질을 관찰 할 수 있었고, 배양 4주 후에는 von Kossa에 흑색으로 염색되는 골기질을 관찰 할 수 있었다. 이는 혼합 스케폴드 중 DMB내에 있는 골유도 단백질(bone morphogenetic proteins, BMP)들이 유리되어 미성숙 SKPs가 골화세포로 분화한 것이라고 추측할 수 있다. 즉, 본 실험을 통하여 DMB 및 fibrin glue 혼합 스케폴드는 피부유래 전구세포의 성장이나 분화를 방해하지 않고, 오히려 골세포 분화에 유리한 조건을 제공한다고 주장 할 수 있을 것이다.

또한, 본 연구에서는 피부유래 전구세포의 생체내 골화정도를 연구하기 위하여 자가 피부유래 전구세포와 DMB 및

fibrin glue 혼합 스키펴드를 실험동물의 하악골 결손부에 이식 후 2주와 4주 후 골형성 정도를 관찰 하였다. 그 결과 자가 피부유래 줄기세포를 이식한 군이 전구세포 없이 스키펴드만 이식한 대조군에 비해 월등히 많은 신생골 형성과 골형성 단백질인 osteocalcin의 강한 발현을 관찰 할 수 있었다. 향후 장기적인 경과 관찰이 필요할 수 있지만, 상기의 결과는 자가 피부유래 전구세포의 이식이 골이식의 대체방법으로 사용될 수 있음을 보여준다.

V. 결 론

저자는 본 연구에서 미니돼지 이부의 피부를 채취해 약 2-3주간 배양 후 균일한 모양의 줄기세포로 추정되는 세포를 추출하였으며, 이러한 피부유래 전구세포(SKPs)에 대한 DBM 및 fibrin glue 혼합 스키펴드의 유해성을 검사하기 위하여 약 4주간 비골화유도 배지에서 공동 배양하였다. 4주의 공동 배양기간 동안 DBM 및 fibrin glue 혼합 스키펴드 사이에서 잘 유지되는 SKPs를 관찰 할 수 있었고, 그 수도 시간이 지날수록 증가되어 관찰 되었다. 또한, 공동 배양 배지가 비골화유도 배지임에도 불구하고, 약 4주간의 배양 후 von Kossa에 염색되는 골기질을 관찰 하였으며, 이는 DBM 내에 있는 BMP 때문인 것으로 추정된다. 따라서, DBM 및 fibrin glue 혼합 스키펴드는 전구세포의 성장을 저해하지 않고, 오히려 골세포로의 분화 유도에 도움을 준다고 할 수 있다.

피부유래 전구세포의 생체내(*in vivo*) 골형성 정도를 관찰하기 위하여, 미니돼지의 하악골골체부에 가로 1.5 cm × 세로 1.5 cm × 깊이 1 cm의 골결손부를 형성한 후 자가 피부유래 전구세포와 DBM 및 fibrin glue 스키펴드와 함께 이식하였으며, 대조군에는 피부유래 전구세포 없이 스키펴드만 이식하였다. 이식 2주와 4주 후 대조군 보다 SKPs를 이식한 실험군에서 월등히 높은 osteocalcin의 발현이 관찰 되었고, 대조군 보다 많은 양의 신생골소주의 형성이 관찰 되었다.

향후 추가적인 연구가 진행되어야 하겠지만, 본 연구 결과로 다양한 분야의 재생의학에 보다 채취가 간단하면서 다능성의 특징을 갖춘 피부유래 전구세포를 이용할 수 있을 것이며, 특히 안면골 재생에 자가피부유래 전구세포를 이용함으로써 자가골 이식에 따른 공여부 합병증과 합성골 이식에 따른 면역반응 등을 줄일 수 있으리라 기대된다.

References

1. Park BW, Kim JR, Lee JH *et al* : Expression of nerve growth factor and vascular endothelial growth factor in the inferior alveolar nerve after distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35 : 624, 2006.
2. Byun JH, Park BW, Kim JR *et al* : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors after mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36 : 338, 2007.
3. Choi MJ, Byun JH, Kang EJ *et al* : Isolation of porcine multipotential skin-derived precursor cells and its multilineage differentiation. *J Kor Assoc Oral Maxillofac Surg* 34 : 588, 2008.
4. Wagers AJ, Weissman IL : Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116 : 639, 2004.
5. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA *et al* : Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 85 : 966, 2006.
6. Shi C, Zhu Y, Su Y *et al* : Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trend Biotech* 24 : 48, 2006.
7. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ *et al* : Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3 : 778, 2001.
8. Dyce PW, Zhu H, Craig J *et al* : Stem cells with multilineage potential derive from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun* 316 : 651, 2004.
9. Buranasup S, Sila-asna M, Bunyaratvej N *et al* : In vitro osteogenesis from skin-derived precursor cells. *Develop Growth Differ* 48 : 263, 2006.
10. Kajahn J, Gorjup E, Tiede S *et al* : Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *Eur J Cell Biol* 87 : 39, 2008.
11. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D *et al* : Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23 : 727, 2005.
12. Marchesi C, Pluderi M, Colleoni F *et al* : Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *GLIA* 55 : 425, 2007.
13. Zhao M, Isom SC, Lin H *et al* : Tracing the stemness of porcine skin-derived progenitors (pSKP) back to specific marker gene expression. *Cloning Stem Cells* 11 : 111, 2009.
14. Carlin R, Davis D, Weiss M *et al* : Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4 : 8, 2006.
15. Fernandes KJL, Mckenzie IA, Mill P *et al* : A dermal niche for multipotent adult-derive precursor cell. *Nat. Cell Biol.* 6 : 1082, 2004.
16. Fernandes KJL, Kobayashi NR, Gallagher CJ *et al* : Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Exp. Neurol.* 201 : 32, 2006.
17. Hunt DPJ, Morris PN, Sterling J *et al* : A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem Cells* 26 : 163, 2008.
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* 31 : 34, 2003.
19. Wheeler SL, Holmes RE, Calhoun CJ : Six-year clinical and histologic study of sinus-lift grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11 : 26, 1996.
20. Chen F, Feng X, Wu W *et al* : Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36 : 822, 2007.
21. Yamada Y, Ueda M, Naiki T *et al* : Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental

- implants. Clin Oral Impl Res 15 : 589, 2004.
22. Park BW, Hah YS, Kim DY *et al* : Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. Arch Oral Biol 52 :983, 2007.
 23. Schimming R, Schmelzeisen R : Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. J Oral Maxillofac Surg 62 : 724, 2004.
 24. Zizelmann C, Schoen R, Metzger MC *et al* : Bone formation after sinus augmentation with engineered bone. Clin Oral Impl Res 18 : 69, 2007.
 25. Fuerst G, Tangl S, Gruber R *et al* : Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: preliminary findings. Clin Oral Impl Res 15 : 733, 2004.
 26. Springer IN, Nocini PF, Schlegel KA *et al* : Two techniques for the preparation of cell-scaffold constructs suitable for sinus augmentation: step to clinical application. Tissue Engineering 12 : 2649, 2006.
 27. Perka C, Schultz O, Spitzer RS *et al* : Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with biosorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. Biomaterials 21 : 1145, 2000.
 28. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R *et al* : Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. J Cranio Maxillofac Surg 31 : 27, 2003.
 29. Schwarz N, Redl H, Schlag G *et al* : The influence of fibrin sealant on demineralized bone matrix-dependent osteoinduction. A quantitative and qualitative study in rats. Clin Orthop Relat Res 238 : 282, 1989.
 30. Yamada, Y, Nakamura S, Ito K *et al* : Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6-year follow-up. Tissue Eng Part A 14 : 1699, 2008.
 31. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G *et al* : Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. J Oral Maxillofac Surg 67 : 265, 2009.
 32. Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P *et al* : Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. Clin Oral Impl Res 17 : 312, 2006.
 33. Fürst G., Gruber R, Tangl S *et al* : Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. Clin Oral Impl Res 14 : 500, 2003.
 34. Schaaf H, Streckbein P, Lendeckel S *et al* : Topical use of platelet-rich plasma to influence bone volume in maxillary augmentation: a prospective randomized trial. Vox Sang 94 : 64, 2008.

저자 연락처

우편번호 660-702
경남 진주시 칠암동 90
경상대학교 의학전문대학원 치과학교실 구강악안면외과
박봉욱

원고 접수일 2009년 04월 13일
게재 확정일 2009년 05월 13일

Reprint Requests

Bong-Wook Park

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Chilam-dong 90, Jinju-city, Gyeongnam 660-702, Korea
Tel : +82-55-750-8264 Fax : +82-55-761-7024
E-mail : parkbw@gsnu.ac.kr

Paper received 13 April 2009
Paper accepted 13 May 2009