HA/TCP 골이식재상에 이식된 지방유래 줄기세포의 골모세포로의 분화 및 골형성에 대한 연구

임재석 · 권종진 · 장현석 · 이의석 · 정유민 · 이태형 · 박정균
고려대학교 의과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

BONE REGENERATION WITH ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL AND HA/TCP

Jae-Suk Rim, Jong-Jin Kwon, Hyon-Seok Jang, Eui-Seok Lee, You-Min Jeong, Tai-Hyung Lee, Jeong-Kyun Park
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Korea University

Aim of the study: An alternative source of adult stem cells that could be obtained in large quantities, under local anesthesia, with minimal discomfort would be advantageous. Adipose tissue could be processed to obtain a fibroblast-like population of cells or adipose tissue-derived stromal cells (ATSCs). This study was performed to confirm the availability of ATSCs in bone tissue engineering.

Materials & methods: In this study, adipose tissue-derived mesenchymal stem cell was extracted from the liposuctioned abdominal fat of 24-old human and cultivated, and the stem cell surface markers of CD 105 and SCF-R were confirmed by immunofluorescent staining. The proliferation of bone marrow mesenchymal stem cell and ATSCs were compared, and evaluated the osteogenic differentiation of ATSCs in a specific osteogenic induction medium. Osteogenic differentiation was assessed by von Kossa and alkaline phosphatase staining. Expression of osteocyte specific BMP-2, ALP, Cbfa-1, Osteopontin and osteocalcin were confirmed by RT-PCR. With differentiation of ATSCs, calcium concentration was assayed, and osteocalcin was evaluated by ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay). The bone formation by 5-week implantation of HA/TCP block loaded with bone marrow mesenchymal stem cells and ATSCs in the subcutaneous pocket of nude mouse was evaluated by histologic analysis.

Results: ATSCs incubated in the osteogenic medium were stained positively for von Kossa and alkaline phosphatase staining. Expression of osteocyte specific genes was also detected. ATSCs could be easily identified through fluorescence microscopy, and bone formation *in vivo* was confirmed by using ATSC-loaded HA/TCP scaffold.

Conclusions: The present results show that ATSCs have an ability to differentiate into osteoblasts and formed bone *in vitro* and *in vivo*. So ATSCs may be an ideal source for further experiments on stem cell biology and bone tissue engineering.

Key words: Adipose tissue-derived stromal cells (ATSCs), Bone tissue engineering, Osteogenic medium

Ⅰ. 서 론

골 결손부의 재생이나 골이식술 및 임프란트의 치료에 있어서 골융합(osseointegration)을 증진시키기 위한 조직공학적 기법의 적용에 있어 최근에 와서 널리 관심을 가지게 된 줄기세포의 기원에는 골수 줄기세포가 가장 많이 사용되고 있지만[1-5] 자가 골수 줄기세포의 채취에는 동통, 감염의 위험성 및 그 채취량에 있어 제한이 따르기 때문에 최근에

* 본 연구는 고려대학교 재직교원 특별연구비(과제번호: K061941)의 지원에 의하여 수행되었음.

와서 줄기세포의 대체 채취원으로 국소마취아래 용이하게 다량으로 채취가 가능한 지방 줄기세포가 제시되고 많은 연구가 이루어지고 있다.[6-18]

지방 조직에서 유래되는 줄기세포는 processed lipoaspirate (PLA) cells, 혹은 adipose tissue-derived stem cells (ATSC) 등으로 불리우는데 골수 줄기세포와 동일하게 배아 간엽(embryonic mesenchyme)에서 유래하고 골모세포, 지방세포, 근세포, 신경세포, 연골세포 등으로 분화할 수 있는 것으로 알려지고 있다. 실제로 지방조직에서 분리된 줄기세포에서 골수 줄기세포와 유사한 세포 표면 marker의 발현이 확인되고 유사한 유전자가 발현되는 것으로 알려지고 있다. 줄기세포는 자가 증식력이 있고 장기간 배양에서도 생존하며 다양한 종류의 세포로 분화가 가능하다. 이와 같은 지방조직 유래 줄기세포는 용이하게 다량을 채취할 수 있어 줄기세포를 이용한 골 재생 등의 조직공학적 적용에 우수한 세포원으로 쓰일 수 있을 것으로 생각되는데 조직공학의 3대 요소인 세포, scaffold 및 신호물질의 상호 작용을 유도하고 이의 기전을 응용하기 위해서는 지방조직 기원 줄기세포의 골모세포로의 분화에 연관된 유전자 발현의 연구가 필요하리라 생각되며 일반적인 골조직 공학 기법의 적용에 널리 시도되고 있는 골수 줄기세포의 경우와 상호 비교, 분석이 필수적이라 사료된다.

이에 본 연구에서는 성인 여성 환자에서 복부 지방 흡인술로 얻어진 지방조직에서 줄기세포를 분리, 배양하여 골모세포로의 분화를 유도하고 BMP-2, alkaline phosphatase, cbfa-1, osteopontin 및 osteocalcin 등의 유전자 발현을 분석하였고 HA/TCP에 지방 줄기세포를 loading하여 nude mouse의 피하에 이식하여 5주 경과 후의 조직학적 소견을 관찰하여 골 형성 정도를 평가해 보아 골 결손부에서의 조직공학적 기법에의 적용이 가능한지 연구해보고자 하였다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 지방 조직 유래 줄기세포와 골수 줄기세포의 분리 및 배양

24세 여자 환자의 동의 아래 복부 지방 흡인술을 통하여 채취된 복부 피하 지방 조직에서 줄기세포를 분리하였다. Halvorsen 등[19]의 방법에 의하여 줄기세포를 분리하는데 먼저 채취된 지방 조직을 Krebs-Ringer액으로 세척하고 collagenase를 이용하여 digestion을 시행하였다. 원심 분리를 시행하여 지방 조직과 혈관 조직을 분리하고 plastic adherence를 이용하여 단핵구 성분을 분리하였다. 분리된 세포를 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS)를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 maintenance medium으로 이용하여 culture expansion을 시행하였다. 지방 줄기세포의 골모세포로의 분화를 유도하기 위하여 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 10 μM dexamethasone, ascorbate 2-phosphate (50 μg/mL)와 100 mM β-glycerol phosphate를 투여하여 배양을 시행하였다. Osiris 사(Osiris Therapeutics, Inc, Baltimore, MD)에서 구입한 골수 줄기세포를 역시 같은 방법을 이용하여 배양하고 골모세포로의 분화를 유도하였다.

2. Immunofluorescent study of CD 105, SCF R

줄기세포의 surface marker인 CD 105와 SCF-R의 발현을 분석하기 위하여 24 well plate에서 원형의 cover glass에서 80% confluent하게 배양된 지방 줄기세포를 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 glutaraldehyde 용액으로 실온에서 10분간 고정 후 PBS로 3회 세척하고 human IgG로 blocking을 시행하였다. 500 ul의 PBS에 10 ul의 fluorescein-conjugated anti-CD 105 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 투여하고 4℃에서 1시간 동안 부란한 뒤 슬라이드 글라스에 고정하여 형광현미경으로 관찰하였다. SCF R의 발현은 anti human SCF R antibody (100 ug/ml, (R&D systems))를 1차 항체로 사용하고 goat IgG의 rhodamin-labeled affinity purified antibody를 2차 항체로 사용하여 관찰하였다.

3. Proliferation assay

지방 줄기세포와 골수 줄기세포를 10% FBS와 antibiotics을 포함하는 DMEM을 maintenance medium으로 이용하여 culture expansion을 시행하였다. 골모세포로의 분화를 유도하기 위하여 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 10 μM dexamethasone, ascorbate 2-phosphate (50 μg/mL)와 100 mM β-glycerol phosphate를 투여하여 배양을 시행하였고 배양 7, 14, 21일에 배양세포를 0.05% trypsin, 0.02% EDTA (Gibco)로 37℃에서 5분간 처리한 후 세포의 수를 hemocytometer를 이용하여 3회 반복하여 측정하였다.

4. Alkaline phosphatase staining 및 von Kossa staining

24 well 배양용기에 줄기세포를 3주 동안 배양하고 7, 14, 21일에 cold PBS로 세포층을 2회 세척한 후 배양 세포층을 ACP mix (acetone:citrate solution:37% paraformaldehyde = 65:25:8)를 이용하여 고정하고 Sigma Diagnostics ALP staining kit를 이용하여 alka-

line phosphatase activity를 측정하였다. von Kossa staining은 역시 7, 14, 21일에 배양세포층을 실온에서 60분간 4% paraformaldehyde로 고정하고 증류수로 세척한 후 빛을 차단한 상태로 1% (wt/vol) silver nitrite solution에 30분간 고정하고 다시 몇 차례 증류수로 세척한 후 60분간 UV light를 조사하였다. 위와 같은 alkaline phosphatase staining과 von Kossa staining을 시행한 24 well plate를 digital camera를 이용하여 촬영하고 염색도를 Scionic PC image analysis software를 이용하여 분석하였다.

5. 골기질 단백 유전자의 발현

세포배양 3, 7, 14, 21일에 RNA를 추출하여 BMP-2, osteopontin, osteocalcin, Cbfa-1과 ALP등의 골형성 관련 단백의 유전자 발현을 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 분석하였다. 모든 결과는 β-actin과의 상대 비교를 시행하며 여기에 사용한 primer는 table 1에 있다. Tri-reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi[20]의 single-step method에 따라 total RNA를 추출하고 UV spectrophotometry (Phamacia, Gene Quant, LKB Biochrom, England)를 사용하여 농도를 측정하고 이중 3.5 μg으로 Superscriptreverse transcriptase (LifeTechnologies, Inc., Gaithersburg, MD)와 oligo (dT)16 primer를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 100 μl 용액을 제조하고 합성된 cDNA의 1/10을 사용하여 PCR을 시행하였다. BMP-2는 30 cycle (95℃에서 1분간 denaturation을 시행하고 cycle을 증가시키면서 95℃에서 45초, 60℃에서 45초, 72℃에서 2분간)을 시행하고, β-actin은 40 cycle (94℃에서 3분간 초기 denaturation, cycle을 증가시키면서 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분)을, osteopontin과 Cbga-1은 40 cycle (94℃에서 3분간 초기 denaturation, cycle을 증가시키면서 94℃에서 1분, 56.5℃에서 1분, 72℃에서 1분), osteocalcin은 40 cycle (94℃에서 3분간 초기 denaturation, cycle을 증가시키면서 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분)의 조건으로 PCR을 시행하였다. 이중 10 μl를 이용하여 ethidium bromide로 염색된 1.5% agarose gel을 UV transillumination으로 관찰하고 digital camera를 이용하여 촬영하고 Scion image analysis software를 이용하여 분석을 시행한다. β-actin에 대한 상대적인 intensity를 구하여 RT-PCR 결과를 분석하였다.

6. Calcium concentration assay

지방 줄기세포와 골수 줄기세포를 osteogenic medium을 투여하여 골모세포로의 분화를 유도하면서 3, 5, 7, 14, 21일에 배양액을 추출하여 calcium 농도를 측정하였다. 배양세포를 2회 PBS로 세척하고 4℃에서 0.1N HCl에 4시간 처리하고 원심분리를 시행하여 세포를 추출하고 Sigma calcium kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 배양액으로부터 calcium의 농도를 3회 반복하여 측정하였다. Calcium의 농도는 전체 단백질 microgram 당 millimolar로 측정하였고 지방 줄기세포와 골수 줄기세포의 경우를 paired Student's t test를 사용하여 통계처리를 시행하였다.

7. Osteocalcin ELISA

지방 줄기세포를 osteogenic medium을 투여하여 골모세포로의 분화를 유도한 군과 maintenance medium만을 사용하여 배양한 군 간의 osteocalcin의 차이를 ELISA

Table1. PCR primer sequence and sizes

PCR oligonucleotide primer sequence and sizes of expected amplification products

Primer	Sequence	Arnplicon size
BMP-2 forward	5'-AGACCTGTATCGCAGGCACT	
BMP-2 reverse	3'-CCAACCTGGTGTCCAAAAGT	350bp
ALP forward	5'-TGAAATATGCCCTGGAGC	
ALP reverse	3'-TCACGTTGTTCCTGTTTAG	475bp
Cbfa-1 forward	5'-CTCACTACCACACCTACCTG	
Cbfa-1 reverse	3'-TCAATATGGTCGCCAAACAGATTC	320bp
OP forward	5'-GCTCTAGAATGAGAATTGCACRG	
OP reverse	3'-GTCAATGGAGTCCTGGCTGT	270bp
OC forward	5'-GCTCTAGAATGGCCCTCACACTC	
OC reverse	3'-CGATATCCTAGACCGGGCCGTAG	302bp
β-action forward	5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTGGTG	
β-action reverse	3'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC	202bp

(Enzyme-linked immunosorbant assay)를 이용하여 분석하였다. 24 well plate에 3×10^4개의 줄기세포를 넣어 배양을 시행한 후 각 3, 5, 7, 14, 21일에 15 nM HEPES (pH 7.4)와 antibiotic을 포함하는 serum-free DMEM의 24 시간 conditioned medium을 이용하여 ELISA를 시행하여 mL 당 nanogram 단위로 3회 반복하여 측정하고 paired Student's t test를 사용하여 통계처리를 시행하였다.

8. 동물실험

1) Scaffold

본 연구에는 synthetic hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramic 60:40% (Zimmer. Warsaw, In) (HA/TCP 60:40)를 5 × 5 × 5 mm 크기의 블록형태로 만들어 초음파 세척 후 250℃에서 4시간 동안 depyrogenation을 이용하여 소독을 시행하여 사용하였다.

2) 줄기세포의 배양 및 loading

1.5 ml microcentrifuge tube에 1.0 ml의 DMEM을 넣고 1.5×10^5개의 지방 줄기세포를 투여 한 후 몇차례 뒤집어 가며 37℃에서 5시간동안 부란시킨다. 세포의 투여는 50 ml conical tube와 3-way를 이용하여 suction을 연결하여 음압을 가하며 지지체를 뒤집어 가며 투여하였다. 지방 줄기세포를 투여하지 않고 HA/TCP 만을 DMEM내에 넣어 대조군으로 사용하였다 (N = 4).

3) 조직학적 소견

세포를 이식한 실험군과 세포를 이식하지 않은 대조군의 scaffold를 nude mouse (한림, 서울)의 등의 정중부에 절개를 가하여 피하 조직층에 이식하고 3-0 black silk를 이용하여 피부를 봉합한 후 5주후 동물을 희생하여 등의 정중부에 절개를 가하여 scaffold와 주위조직을 제거한 후 즉시 4% paraformaldehyde에 3시간 고정하고 탈회시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 그 소견을 관찰하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. Immunofluorescent study of CD 105, SCF R

지방조직 유래 줄기세포를 분리, 배양한 결과, 줄기세포의 표지자로 알려진 CD 105, SCF R에서 염색을 확인하여 피하 지방 조직에서 Halvorsen등의 방법에 의하여 추출한 세포가 중간엽 줄기세포임을 확인하였다(Fig. 1).

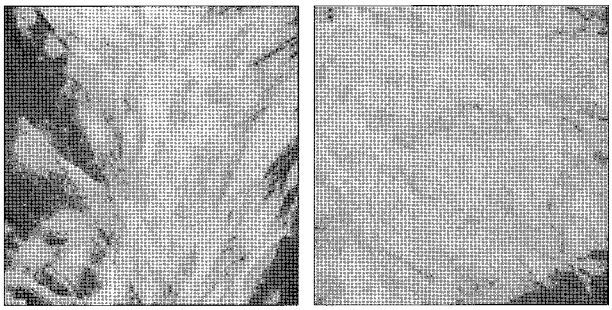

Fig. 1. Immunofluorescent study (Left: CD 105-1, Right: SCF R-1).

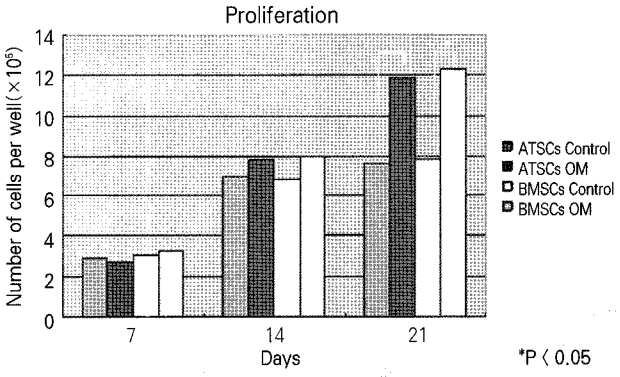

Fig. 2. Proliferation assay results of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs) and adipose tissue-derived stem cell (ATSCs) of 7, 14, 21 days of cultivation. (Control: nonosteogenic culture, OM: Osteogenic culture).

2. Proliferation assay

Proliferation assay 결과 골수 줄기세포와 지방조직 유래 줄기세포 모두에서 osteogenic medium 투여시 시간 경과에 따라 proliferation이 증가되는 양상이었고 특히 3주 소견에서 osteogenic medium 투여시 대조군에 비하여 세포의 수의 증가가 현저하였다(지방줄기세포: 대조군: $7.6 \pm 0.8 \times 10^5$, OM: $11.8 \pm 1.1 \times 10^5$, 골수줄기세포: 대조군: $7.8 \pm 0.9 \times 10^5$, OM: $12.3 \pm 0.7 \times 10^5$)(Fig. 2).

3. Alkaline phosphatase staining 및 von Kossa staining

지방조직 유래 줄기세포를 배양하였을 때 ALP staining, von Kossa staing 모두에서 osteogenic medium을 넣었을때 control의 경우보다 염색도가 증가되어 있는 것을 보여주고 있었다(Fig. 3). 골수 줄기세포와 지방조직 유래 줄기세포를 osteogenic medium을 넣어 배양하였을 때 시간 경과에 따른 ALP activity를 나타내는 결과로 시간 경과에

따라 ALP activity가 증가되는 양상이었었고 7일과 14일 소견에서 골수 줄기세포의 경우에 지방조직 유래 줄기세포보다 ALP가 현저하게 높게 발현되고 있었다(Fig. 4).

4. Calcium concentration assay

골수 줄기세포와 지방조직 유래 줄기세포를 osteogenic medium을 투여하여 배양한 경우의 배양액에서의 칼슘 농도를 측정한 결과로 21일 소견에서 골수 줄기세포에서의 ca concentration이 지방조직 유래 줄기세포보다 높게 나타났지만 전반적으로 양측간에 큰 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 5).

5. Osteocalcin ELISA

ELISA 를 이용하여 지방조직 유래 줄기세포의 osteocalcin의 발현을 평가하였을 때 osteogenic medium을 넣어 배양하였을 때 osteocalcin의 발현이 높게 나타나고 있었다(Fig. 6).

6. 골기질 단백 유전자의 발현

지방조직 유래 줄기세포에 osteogenic medium을 넣어 배양한 경우와 control medium만을 넣어 배양한 경우의 RT-PCR 결과로 BMP-2의 발현은 관찰되지 않았고

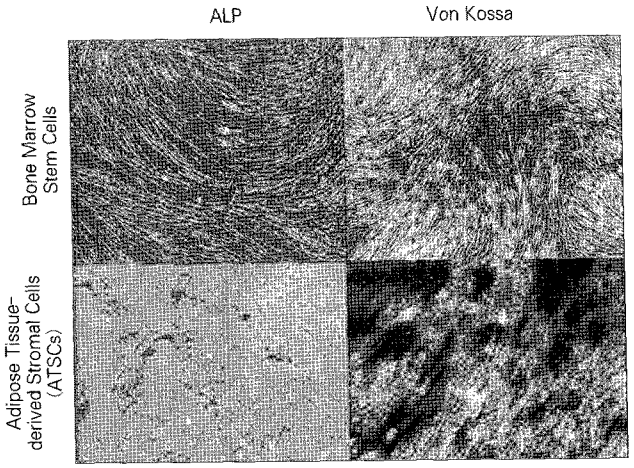

Fig. 3. ALP staining & von Kossa staining of 3 week culture.

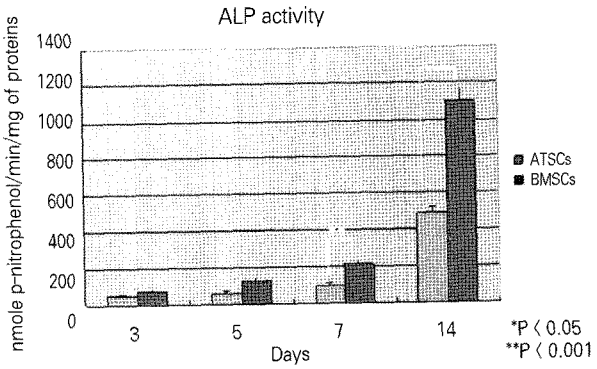

Fig. 4. ALP activity of 3, 5, 7, 14 days of culture.
(ATSCs: Adipose Tissue-derived Stromal Cells, BMSCs: bone marrow stem cell)

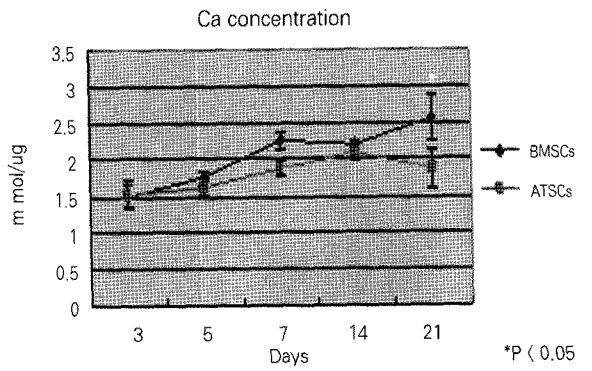

Fig. 5. Caicium concentration assay of 3, 5, 7, 14, 21 days of culture.
(m mol/ug, ATSCs: Adipose Tissue-derived Stromal Cells, BMSCs: bone marrow stem cell)

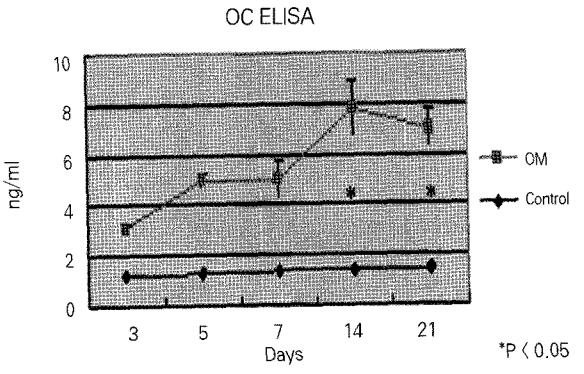

Fig. 6. Osteocalcin ELISA (ng/ml).

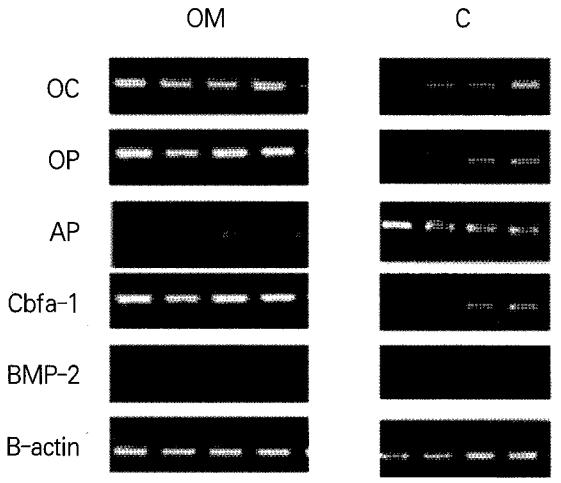

Fig. 7. RT-PCR results of BMP-2, osteopontin, osteocalcin, Cbfa-1 and ALP gene expression.
(OM:osteogenic medium, C: control)

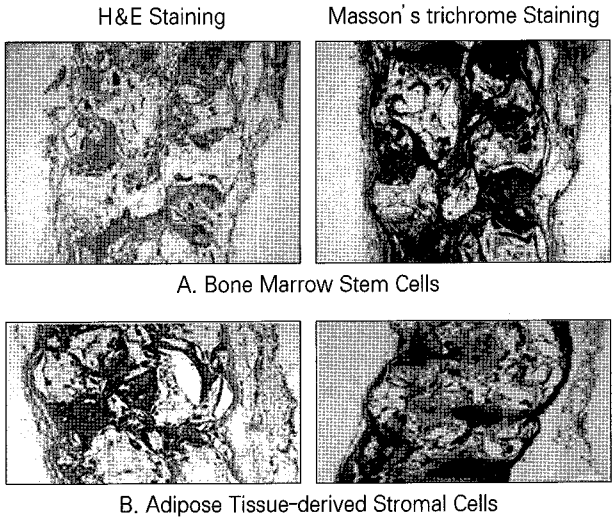

Fig. 8. Histologic findings of 5 weeks after implantation.
(A: BMSCs-loaded HA/TCP, Left: H&E staining, Right: Masson's trichrome staining, B: ATSCs-loaded HA/TCP, Left: H&E staining, Right: Masson's trichrome staining)

osteocalcin, osteopontin, cbfa-1은 osteogenic medium을 투여하였을 때 control에 비해 발현이 증가되어 있었고 alkaline phosphatase는 control에서 발현이 증가되어 있는 양상이었다(Fig. 7).

7. 조직학적 소견

Mouse의 dorsal subcutaneous pocket에 이식된 scaffold의 조직소견에서 pore 내부에 woven bone의 형성이 관찰되고 있었으며 신생 혈관의 침투 및 dense connective tissue가 관찰되고 연골이나 지방조직의 형성은 관찰되지 않고 있었는데 지방줄기세포를 loading한 경우보다 골수줄기세포를 이용한 경우에 신생골 형성이 다소 우세한 것으로 보이고 있었다(Fig. 8).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 구강내의 buccal fat pad와 같이 국소마취하에 용이하게 채취해서 사용이 가능한 지방조직 유래 줄기세포의 골모세포로의 분화가능성을 확인하고 지방조직 유래 줄기세포와 장골에서 추출한 골수 줄기세포를 osteogenic medium에서 배양하여 scaffold에 loading시키고 nude mouse의 subcutaneous pocket에 이식한 후 골 형성 정도를 조직학적으로 비교 분석하여 골 조직공학에서 지방조직 유래 줄기세포가 골수 줄기세포의 대체 채취원으로서의 유용성을 확인하고자 하였다.

골수 조직 간엽 줄기세포에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있는데, 골수 간엽 줄기세포는 *in vitro*에서 골모세포로 분화하여 골 형성 과정을 거치는 것으로 알려져 있다.[4,12,21,22] 최근에는 골수 줄기세포의 대체 채취원으로 국소마취아래 용이하게 다량으로 채취가 가능한 지방조직 유래 줄기세포가 제시되고 많은 연구가 이루어지고 있으며,[6-19,23] Zuk 등[12]은 지방 조직에서 유래한 줄기세포 또한 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다고 보고 하였다. 지방조직 유래 줄기세포는 지방 조직으로 분화할뿐 만 아니라 골수에서 유래한 줄기세포와 유사하게 골모세포로도 분화할 수 있는 것으로 알려지고 있으며,[6-17] 지방조직 유래 줄기세포와 골수 줄기세포는 분화 능력, 세포 부착력, 성장 역학, 유전자 형질 도입능에 있어서 특이한 차이점을 보이지 않는다고 하였다.[18] 지방조직 유래 줄기세포가 지방세포 혹은 골모세포로 분화 하는데에는 밀접한 관련이 있다는 몇몇 연구가 보고 되었으며, 지방세포는 골수강의 골모세포가 감소한 자리를 채워 골 밀도 감소를 유발한다고 하였다.[24-27] 간엽 줄기세포로부터 다양한 세포들로 분화함에 있어서 여러 세포들의 교차 분화는 그 기전이 명확하게 알려져 있지 않으며, 배양액의 구성분과 성장인자들의 첨가, 역학적 자극, 세포내 신호 전달 인자의 조절에 따라 골모세포와 지방세포간의 교차 분화가 일어난다고 하였다.[28-35] Hattori 등[36]은 골수 유래 줄기세포와 지방 유래 줄기세포를 osteogenic medium에서 배양한 후 골 형성의 초기 marker로서 ALP를 분화의 최종단계에서는 osteocalcin의 발현을 확인하였으며, scaffold에 세포를 loading하여 nude mouse에 이식한 결과 줄기세포를 이식하지 않은 대조군에 비해 양호한 골 형성 결과를 보고 하였는데 특히 8주후 soft X-ray소견

에서는 지방조직 유래 줄기세포의 경우에 골수 줄기세포보다 훨씬 양호한 결과를 보고하였다. Zuk 등[12]은 적절한 osteogenic medium에서 지방조직 유래 줄기세포를 배양하였을 때 multilineage로 분화할 수 있음을 보여 주었지만 골수 유래 줄기세포보다는 조직 재생능이 떨어지는 것을 보고하였는데 Halvorsen 등[19]의 연구에 의하면, 인간의 지방 유래 줄기세포가 골모 세포로 분화되었으며, Bennett 등[23]과 Jaiswal 등[32]은 백서의 골수 조직에서 추출된 지방 세포가 골모세포로 분화됨을 보고 하였다. Huang 등[15]은 백서의 서혜부의 지방 조직 세포들이 골모세포 및 조연골 세포로 분화 됨을 보고 하였다. 여러 연구에서 CD marker antigen이 골수 유래 줄기세포와 지방 유래 줄기세포에서 차이가 있었고[37], Wickham 등[17]도 인간의 patella fat pad로부터 추출한 지방 유래 줄기세포가 골수 유래 줄기세포와의 cell surface profile이 상이함을 보고하고 있고 Winter 등[38]도 유사한 결과를 보고하고 있다. 반면 Ugart 등의 연구에서는 동일인으로 부터 추출한 골수 유래 줄기세포와 지방 유래 줄기세포 사이에서 세포 추출력이나 성장능, 세포의 노화 과정이나 다분화성에서 큰 차이가 없음을 보고하고 있다. Lee 등[39]의 연구에서 DMEM에서 지방 줄기세포를 배양했을 시 30 passage이상 증식능을 유지했고 a-MEM에서 지방 줄기세포는 20 passage에서 성장이 멈추었음을 보고하였는데 본 연구에서도 동일하게 DMEM을 사용하여 지방 유래 줄기세포의 증식과 분화를 유지하는데 사용하였다. Im 등[40]의 연구에서는 DMEM-F12를 기본 배양액으로 지방 줄기세포와 골수 줄기세포를 배양했을 시 골수 유래 줄기세포보다 지방 유래 줄기세포의 분화능이 떨어짐을 보고하였는데 이러한 결과로 미루어 보아 배양조건이 세포의 증식과 분화에 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

지방조직 유래 줄기세포를 배양함에 있어서 골 형성 유도 배양액으로 0.1 μM dexamethasone, 50 μM ascorbate 2-phosphate (50 μg/mL)와 100 mM β-glycerophosphate를 투여하여 골수 줄기세포로의 분화를 유도하여 배양한 경우, 골 형성 분화 과정이 빠르게 진행되고 골모세포의 형태가 명확하며, ALP와 osteocalcin의 발현이 증가하고 세포외 기질의 mineralization이 증가하는 것으로 알려지고 있는데,[41,42] dexamethasone은 *in vitro*에서 줄기세포의 osteogenesis를 유도하고 bone nodule을 형성하는데 절대적으로 필요한 것으로 생각되며, ascorbic acid는 collagen의 lysine residue와 proline의 합성을 증가시키며, β-glycerophosphate는 세포 기질의 calcification에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. *In vitro*에서 osteogenic medium을 투여하여 줄기세포를 골모세포로 분화시키는데 있어서 그 성공 여부는 osteocalcin의 발현 유무로 판단할 수 있는데 bone protein으로 알려진 osteocalcin은 골조직에서만 생성되고 골의 turnover의 생화학적 indicator로 이의 생성은 대사적으로 활성된 골세포의 존재를 의미한다.[43] 지방조직 유래 줄기세포를 dexamethasone을 포함하는 골 형성 유도 배양액으로 배양하였을 경우 AP의 활성이 증가하고 조직학적으로 배양된 기질의 mineralization이 증가한다. 더욱이 proliferation, matrix synthesis, mineralization 각각의 시기마다 dexamethasone을 포함하는 골형성 유도 배양액의 효과가 명확하게 나타나는데 간엽 줄기세포의 분화 양상에 있어서 dexamethasone의 첨가 농도와 첨가 시기가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[34,35] 그러나, 골형성 유도 배양액에서 dexamethasone과 같은 glucocorticoids의 효과에 대해 상이한 결과를 나타내는 연구가 있으며,[44] 따라서 dexamethasone을 대체하여 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD)를 포함하는 골형성 유도 배양액을 사용하는 연구에서 줄기세포의 분화 과정에서 dexamethasone을 사용한 경우에서는 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD)를 사용한 경우보다 AP 활성도가 현저하게 저하되어 나타나고 골수 줄기세포의 경우에 dexamethasone을 사용한 경우에서 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD)를 사용한 경우보다 AP 활성도가 증가되었으며, 이는 골수 줄기세포와 지방 줄기세포의 배양 유도 상황에 따른 서로 다른 반응으로 인한 것으로 보고하고 있다.[37] 또한 줄기세포의 분화 연구에서 transforming growth factor (TGF)-β, tumor necrosis factor-α, interleukin (IL)-1, retinoic acid등의 물질들은 골모세포로의 분화를 촉진 시키고 지방세포 분화를 억제 하며, indomethacin, isobutyl-methylxanthin (IBMX), insulin, glucocorticoids, thiazolidinediones (TZD) 등은 지방세포 분화를 촉진시키고 골모세포로의 분화를 억제하는 것으로 알려지고 있다.[27,45] 본 연구에서는 골형성 유도 배양액으로 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 10 μM dexamethasone, ascorbate 2-phosphate (50 μg/mL)와 100 mM β-glycerophosphate를 투여하여 배양을 시행하였으며, 지방세포 유래 줄기세포의 골 세포의 분화능을 확인할 수 있는 ALP 염색, von Kossa 염색 결과를 보면, 골 형성 유도 배양액을 넣고 28일간 배양한 결과, 시간이 경과함에 따라 염색도가 현저히 증가됨을 확인하였다.

Owen[46]은 골 발육단계를 기질 분비와 함께 proliferation, matrix maturation 그리고 matrix mineralization의 3단계로 분류하였는데, 이 단계별로 특징적인 유전자의 발현이 두드러진다고 하였다. Proliferation기에는 collagen I이 matrix maturation기에는 ALP, osteopontin (OP), osteonectin (ON)등의 발현이 mineralization기에는 bone sialoprotein (BSP)과 osteocalcin (OC)의 발현이 특징적이라고 하였는데ALP는 골 형성초기의 marker로 미성숙 골모세포로의 분화 초기에 ALP의 활성이 나타나는

데 보통 4일에서 발현되어 12일정도에 최고의 활성도에 도달한다. 골조직에서 발현이 증가될 분만 아니라 ALP는 연골, 간, 신장 등에서도 관찰되는데 ALP는 기타 osteogenic-specipic marker와 conjugation해서 골 형성의 indicator로 이용되는데 그중 하나가 ECM matrix의 calcification 인데 von Kossa staining 으로 평가된다.[12]

Osteogenesis를 알아보기 위해 OC, cbfa-1, ON, OP, ALP, BMP-2 등의 여러 유전자의 발현 유무를 RT-PCR을 이용하여 확인하였는데 cbfa-1의 발현은 지방 유래 줄기세포와 골수 유래 줄기세포의 골모세포로의 분화에서 발현되는 유전자로 알려져 있으며 여러 골 형성 유전자의 promotor와 결합하는 transcription factor이다.[37] *In vitro*에서의 다른 연구에서와 마찬가지로 본 연구에서도 지방 유래 줄기세포를 osteogenic medium에 배양했을시 cbfa-1과 OC, OP의 높은 발현을 보여 주었고 BMP-2는 osteogenic medium에서 배양했을 시와 대조군 모두에서 발현이 관찰돠지 않아 Zuk 등[37]의 연구와 동일하였다. 그러나 일반적으로 cbfa-1은 골모세포로의 분화 유도 초기에 발현되고 점차 발현이 감소되고 OC은 골모세포로의 분화 유도가 진행됨에 따라 증가되지만 본 연구의 결과에서는 cbfa-1과 OC 의 발현이 비슷한 양상을 보이고 있어 알려진 것과는 다른 양상을 보이고 있어 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 1965년 Urist 등이 BMP가 골유도성을 가진다고 보고한 이후 가장 널리 연구된 골유도 인자 중의 하나인 BMP는 유전자 재조합 기술의 발달로 골유도능을 지닌 다양한 BMP의 생산이 가능하게 되었는데 재조합된 BMP들은 줄기세포의 골모세포로의 분화에 작용하며 이의 역할이 보고되고 있다.[43] 본 연구에서 특이할 만한 것은 immunohistochemistry에서 ALP의 발현은 관찰되지 않았고 오히려 osteogenic medium에서 배양하지 않은 대조군에서 발현이 나타났는데 이결과는 ALP staining에서 양성인 것 과는 상반된 결과로서 소량의 유전자들을 증폭하는 과정에서 발생한 실험적인 오차가 아닐까 하는 생각이다. OC의 경우에 있어서도 골형성 최종단계인 mineralization시기 뿐아니라 초기 7일에서도 발현된다는 보고[37] 등 다양한 보고 결과들로 미루어 보아 골형성 단계에서 발현되는 유전자에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다. 본 연구에서 2주에서의 ALP staining이 양성으로 나타났고, osteogenic medium에서 3주 동안 배양한 후 von Kossa staining 역시 같은 소견을 보여 Zuk 등의 연구에서와 동일한 결과를 보이고 있었다.

본 연구의 proliferation분석에서는 7, 14, 21일에서 골수 유래 줄기세포가 지방 유래 줄기세포보다 근소하나마 proliferation이 증가되어 있고 ALP activity에서는 골수 유래 줄기세포가 지방 유래 줄기세포보다 특히 7일에서 통계학적으로 유의할 만한 차이를 보여주고 있어 지방 유래 줄기세포가 골 형성능에 있어 골수 유래 줄기세포보다 떨어짐을 나타내고 있었다. 그리고 Ca concentration assay에서도 미약하나마 골수 유래 줄기세포가 우위에 있어 *in vitro*에서 본 연구의 결과로 미루어보아 골수 유래 줄기세포의 대체 채취원으로서 지방 유래 줄기세포가 골수 줄기세포보다 골모세포로의 분화 및 골 형성능에 있어 약간 미흡함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Lee 등[43]의 연구와는 상반되고 Im 등[40]의 연구와는 비슷한 결과를 보여준다 할 수 있다.

많은 동물실험을 통한 골 재생 연구에서는 type 1 collagen matrix gel, hyalouronic acid-based polymers, polylactide/polyglycolide sponge 그리고 hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramic등의 다양한 scaffold들이 사용되고 있는데 본 연구에서는 골 형성능이 뛰어난 것으로 알려진 HA/TCP를 scaffold로 사용하여 지방 유래 줄기세포와 골수 유래 줄기세포를 이식하고 5주후 조직학적 소견에서 미약하나마 골수 유래 줄기세포에서 더 많은 조직학적 골형성 소견을 보여주었는데 향후 *in vivo*에서 scaffold의 조성과 구조에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과로 보아 synthetic HA/TCP 에 골수 줄기세포 및 지방조직 유래 줄기세포를 loading하면 양호한 신생골 형성을 보여 지방 조직 유래 줄기세포가 조직공학적 기법을 이용한 골 결손부의 회복이나 골재생에 골수 줄기세포를 대체할 수 있을 것으로 생각된다. 향후 scaffold의 화학적 조성 및 그 형태에 따른 이식세포에 의한 신생골 형성에 대한 추가적인 연구 및 유전자 발현 비교 분석을 통하여 골재생에 적용될 수 있는 조직공학적 기법의 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

성인의 지방 조직에서 유래된 지방 줄기세포를 골모세포로의 분화를 유도하기 위하여 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 10 nM dexamethasone, ascorbate 2-phosphate (50 ug/mL)와 100 mM β-glycerophosphate를 투여하여 28일간 배양하여 염색, RT-PCR, ALP 활성도, western blot analysis를 시행하여 분화 동안의 형태, 유전자 표현, 신호 전달 기전의 변화 양상을 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 지방조직 유래 줄기세포는 osteogenic medium을 투여하면 골모세포로 분화되고 시간 경과에 따라 mineralization을 보였다.
2. 골기질 단백 관련 유전자 발현에서 OC, OP, Cbfa-1 등 골기질 유전자의 발현이 osteogenic medium을 투여한 경우 발현이 증가되어 있었다.

3. Osteogenic medium을 투여한 경우에 시간 경과에 따라 지방조직 유래 줄기세포는 Ca과 osteocalcin의 발현이 증가되어 있었다.
4. Nude mouse의 subcutaneous pocket에 지방조직 유래 줄기세포를 HA/TCP에 loading하여 이식하고 5주 경과 소견에서 골수 줄기세포의 경우와 유사하게 신생골의 형성을 보이고 있었다.

위의 연구 결과를 통하여, synthetic HA/TCP에 골수 줄기세포 및 지방 조직 유래 줄기세포를 loading하면 양호한 신생골 형성을 보여 지방조직 유래 줄기세포가 조직공학적 기법을 이용한 골 결손부의 회복이나 골재생에 골수 줄기세포를 대체할 수 있을 것으로 생각된다. 향후 scaffold의 화학적 조성 및 그 형태에 따른 이식세포에 의한 신생골 형성에 대한 추가적인 연구 및 유전자 발현 비교 분석을 통하여 골재생에 적용될 수 있는 조직공학적 기법의 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Buma P, Scheurs W, Verdonschot N : Skeletal tissue engineering from *in vitro* study to large animal model. Biomaterials 25 : 1487, 2004.
2. Wiesmann HP, Nazer N, Klatt Ch *et al* : Meyer: Bone Tissue Engineering by Primary Osteoblast-Like Cells in a Monolayer System and 3-Dimensional Collagen Gel.J Oral Maxillofac Surg 61 : 1455, 2003.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al* : Multilineage Potential of Adult Human Mesenchy-mal Stem Cells. Science 284 : 143, 1999.
4. Bianco P, Rimmucci M, Gronthos S *et al* : Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. Stem Cells 19 : 180, 2001.
5. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM *et al* : Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells PNAS 100 : 3305, 2003.
6. Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H *et al* : Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. J Nippon Med Sch 71 : 240, 2004.
7. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A *et al* : Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. Biochem Biophys Res Commun. 23 : 313, 2004.
8. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR *et al* : Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. J Orthop Res. 21 : 622, 2003.
9. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M *et al* : Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. J Bone Joint Surg Br. 85 : 740, 2003.
10. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA *et al* : Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. Ann Plast Surg. 50 : 610, 2003.
11. Huang JI, Beanes SR, Zhu M *et al* : Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. Plast Reconstr Surg 109 : 1033, 2002.
12. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H *et al* : Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7 : 211, 2001.
13. Patrick CJ, Chauvin PB, Hobley J *et al* : Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. Tissue Eng 5 : 139, 1999.
14. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A *et al* : Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex differences. Biochem Biophys Res Commun 25 : 319, 2004.
15. Huang JI, Zuk PA, Jones NF *et al* : Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. Plast Reconstr Surg 113 : 585, 2004.
16. Hicok KC, TV DL, Zhou YS *et al* : Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid *in vivo*. Tissue Eng 10 : 371, 2004.
17. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM *et al* : Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clin Orthop 412 : 196, 2003.
18. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A *et al* : Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organs 174 : 101, 2003.
19. Halvorsen YC, Franklin D, Bond AL *et al* : Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. Tissue Eng 7 : 729, 2001.
20. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162 : 156, 1987.
21. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE *et al* : Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from bone marrow. J Bone Miner Res 11 : 312, 1996.
22. Ikeuchi M, Dohi Y, Horiuchi K *et al* : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes osteogenesis within atelopeptide type I collagen solution by combination with rat cultured marrow cells. J Biomed Mater Res 60 : 61, 2002.
23. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT *et al* : Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. Cell Sci 99 : 131, 1991.
24. Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ *et al* : Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. J Bone Miner Res 11 : 568, 1996.
25. Canalis E : Mechanisms of glucocorticoid action in bone: Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 81 : 3441, 1996.
26. Parhami F, Jackson SM, Tintut Y *et al* : Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. J Bone Miner Res 14 : 2067, 1999.
27. Nuttall ME, Gimble JM : Is there therapeutic opportunity either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis. Bone 27 : 177, 2000.
28. Grigoriadis AE, Heersche JNM, Aubin JE : Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: Effect of Dexamethasone. J Cell Biol 106 : 2139, 1988.
29. Kim CH, Cheng SL, Kim GS : Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. J Endocrinology 162 : 371, 1999.
30. Locklin RM, Williamson MC, Beresford JN *et al* : *In vitro* effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cells. Clin Orthop 313 : 27, 1995.
31. Schiller PC, Dippolito G, Brambilla R : Inhibition of Gap-

Junctional communication induces the transdifferentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype *in vitro*. J Biol Chem 276 : 14133, 2001.
32. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP *et al* : Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 275 : 9645, 2000.
33. Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE : Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. J Biol Chem 273 : 32111, 1998.
34. Chen D, Ji X, Harris MA *et al* : Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. J Cell Biol 142 : 295, 1998.
35. Altman GH, Horan RL, Martin I *et al* : Cell differentiation by mechanical stress. FASEB J 16 : 270, 2002.
36. Hattori H, Sato M, Masuoka K *et al* : Osteogenic Potential of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as an Alternative Stem Cell Source. Cell Tissue Organ 178 : 2, 2004
37. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al* : Human adipose tissucell Vol. 13, 2002, p.4279.
38. Winter A, Breit S, Parsch D *et al* : Cartilarge-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids. Arthritis Rheum 48 : 418, 2003.
39. Lee RH, Kim BC, Choi IS *et al* : Characterizaion and Expression Analysis oh Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. Cell Physiol Biochem 14 : 311, 2004.
40. Im GI, Shin YW. Lee KB : Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic potential as bone marrow-derived cell? OsteoArthritis and Cartilage 13 : 845, 2005.
41. Ohgushi HY, Dohi S, Katsuda S *et al* : *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. J Biomed Mater Res 32 : 333, 1996.
42. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI *et al* : Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. J Cell Biochem 64 : 295, 1997.
43. Lee JA, Parret BM, Conejero JA *et al* : Biologic Alchemy: Engineering Bone Fat From Fat-Derived Stem Cells. Ann Plast Surg 50 : 610, 2003.
44. Cooper MS, Hewison M, Stewart PM : Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. J Endocrinol 163 : 159, 1999.
45. Oreffo RO, Triffitt JT : Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. Bone 25 : 5S, 1999.
46. Owen TA, Aronow MA, Shalhoub V *et al* : Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in-vitro*: reciprocal relationships in the expression of genes associated with osteoblast proliferation and diffentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol 143 : 420, 1990.

저자 연락처
우편번호 152-703
서울특별시 구로구 구로동 80번지
고려대학교 구로병원 구강악안면외과
임 재 석

원고 접수일 2009년 11월 12일
게재 확정일 2010년 02월 10일

Reprint Requests
Jae-Suk Rim
Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Korea University Guro Hospital
80 Guro-dong, Guro-gu, Seoul, 152-703, Korea
Tel: 82-2-2626-3264
E-mail: jaesrim@korea.ac.kr

Paper received 12 November 2009
Paper accepted 10 February 2010