성견 치계줄기세포 및 골수줄기세포 특성에 관한 연구

진민주[1,2], 김영성[1,3], 김수환[1,3], 김경화[1], 이철우[1], 구기태[1], 김태일[1], 설양조[1], 구영[1], 류인철[1], 정종평[1], 이용무[1*]

1. 서울대학교 치의학대학원 치주과학교실 및 치학연구소
2. 한일병원 치과
3. 서울아산병원 치주과

Investigation of postnatal stem cells from canine dental tissue and bone marrow

Min-Ju Jhin[1,2], Young-Sung Kim[1,3], Su-Hwan Kim[1], Kyoung-Hwa Kim[1], Chul-Woo Lee[1], Ki-Tae Koo[1], Tae-Il Kim[1], Yang-Jo Seol[1], Young Ku[1], In-Chul Rhyu[1], Chong-Pyoung Chung[1], Yong-Moo Lee[1*]

1. Department of Periodontology and Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University
2. Department of Dentistry, Hanil General Hospital
3. Department of Periodontics, Asan Medical Center

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to evaluate the stemness of cells from canine dental tissues and bone marrow.
Methods: Canine periodontal ligament stem cells (PDLSC), alveolar bone stem cells (ABSC) and bone marrow stem cells(BMSC) were isolated and cultured. Cell differentiations (osteogenic, adipogenic and chondrogenic) and surface antigens (CD146, STRO-1, CD44, CD90, CD45, CD34) were evaluated in vitro. The cells were transplanted into the subcutaneous space of nude mice to assess capacity for ectopic bone formation at 8 weeks after implantation.
Results: PDLSC, ABSC and BMSC differentiated into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes under defined condition. The cells expressed the mesenchymal stem cell markers differently. When transplanted into athymic nude mice, these three kinds of cells with hydroxyapatite / β- tricalcium phosphate (HA/TCP) carrier showed ectopic bone formation.
Conclusions: This study demonstrated that canine dental stem cells have stemness like bone marrow stem cells. Transplantation of these cells might be used as a therapeutic approach for dental stem cell-mediated periodontal tissue regeneration. ***(J Korean Acad Periodontol 2009;39:119-128)***

KEY WORDS: stem cells ; differentiation ; periodontal ligament ; regeneration.

서론

줄기세포는 다양한 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력과 줄기세포를 계속 공급하는 특수한 형태의 세포 분열이 가능한 줄기성(stemness)을 가진 세포로 정의된다[1,2]. 줄기세포의 이러한 특수한 능력을 연구하고 이를 치료에 이용하려는 시도가 생물학과 관련된 모든 분야에서 이루어지고 있다. 배아줄기세포는 모든 세포와 조직으로 분화할 수 있는 전능한 잠재력을 가지고 있다. 하지만 세포의 특성상 세포분리 방법이 까다롭고 윤리적인 문제 때문에 연구의 많은 부분이 제한되어 있는 상태이다. 이에 반하여 몸의 여러 조직에 존재하고 있는 성체줄기세포는 배아줄기세포에 비해 분화의 다양성에 있어서는 제한이 있지만 최근에 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다양한 서식지(niche)가 발견되어 보다 용이하게 성체줄기세포를 얻을 수 있다[3-5].

성체줄기세포 중 골수에서 유래한 중배엽줄기세포를 이용하여 조직재생을 이루려는 시도가 다양하게 연구되어 왔으며[6,7] 치주조직의 재생에도 효과가 있음이 보고되었다[8]. 근래에는 치수, 치주인대, 치조골 등의 구강조직에서 유래

* Correspondence: Dr. Yong-Moo Lee
Department of Periodontology, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yongon-Dong, Chongno-Ku, Seoul, 110-744, Korea.
E-mail: ymlee@snu.ac.kr, Tel: 82-2-2072-3024,
Fax: 82-2-744-0051
* 이 논문은 2008년도 과학기술부의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. M10646010003-08N4601-00310).
Received: Apr. 7, 2009; Accepted: Apr. 30, 2009

된 줄기세포에 대한 연구가 보고되었으며, 이들 세포를 이용하여 생체 내에서 치주조직과 유사한 조직을 형성할 수 있음이 밝혀졌다[9-11]. 특히 치주인대나 치조골 등 치계조직에서 성체줄기세포를 채취 할 경우에는 조직의 손상을 최소화 할 수 있으며, 제3대구치의 발치의 과정에서도 성체줄기세포를 쉽게 얻을 수 있는 장점을 가진다.

현재 치계줄기세포의 특성에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있으며, 치주조직재생 등의 조직재생공학에 이러한 세포를 이용하기 위해서는 적절한 동물모델을 이용한 추가적인 연구가 필요하다.

성견을 이용한 동물연구는 치주조직재생을 평가하는 연구모델로 많이 이용되고 있다. 저자들은 선행 연구에서, 성견의 치주인대에서 분리된 치계줄기세포가 세포집락형성능과 함께 골세포나 지방세포로 분화할 수 있는 능력을 가지며 중배엽줄기세포 표면항원 물질을 발현함을 보고하였다[12]. 성견에서 치계줄기세포를 확보할 수 있다면, 줄기세포 자가이식을 통한 조직재생공학 연구에 적합한 동물실험모델로서 성견의 이용이 가능하다.

이러한 동물실험모델에서 치계줄기세포를 이용한 조직재생을 연구하기 위해서는 골수유래 줄기세포와 비교하여 치계줄기세포가 가지는 줄기세포 특성을 비교 연구할 필요가 있다. 치계줄기세포는 골수에서 유래한 중배엽줄기세포와 유사하지만 좀 더 분화된 세포라는 보고가 있으며[13], 한 개체의 다양한 부위에서 얻은 성체줄기세포간의 특성에 대한 비교 연구는 아직 부족한 상황이다.

이 연구에서는 성견 골수에서 유래한 줄기세포와 치주인대, 치조골에서 분리된 치계줄기세포를 분리 배양하여 그 특성을 비교, 분석하고 누드 마우스에서의 이소성 골형성능을 평가하려고 한다.

재료 및 방법

1. 성견 치계줄기세포와 골수유래 줄기세포의 분리, 배양

생후 1년 된 2마리의 13-15kg 성견(beagle dog)을 자일리진(5 mg/kg)(한국바이엘, 한국)과 케타민(10 mg/kg)(유한양행, 한국)을 이용하여 전신마취 후 1:10만 에피네프린을 함유한 2% 염산리도카인으로 발거대상 치아 부위 및 장골능 주변 피하조직에 부분마취를 시행하였다.

성견의 치주인대세포를 얻기 위하여, 치석 및 치태를 철저히 제거하고 양측 하악 소구치 및 제1대구치를 발거하였다. 발거 된 치아의 치근 중간 부위에 위치한 치주인대를 큐렛으로 채취하여 collagen type I 및 dispase 용액으로 처리하여 세포를 분리, 배양하였다. 1% antibiotic- anti-mycotic 용액(Invitogen, USA) 및 15% FBS(Invitrogen, USA)가 첨가된 α-MEM(Invitrogen, USA)에 100 μM/L ascorbic acid 2-phosphate를 첨가한 배지를 이용하여 세포배양을 시행하였다. 배양된 세포를 Trypsin-EDTA (Invitrogrn, USA) 처리 후 70 um strainer에 통과시키고 세포현탁액을 10 cm 직경의 배양접시에 옮겨 배양한 후 50개 이상의 세포로 구성된 세포집락군(colony)를 모아 실험에 이용하였다.

성견의 장골능에서 골수를 1 ml 흡입하여, 적혈구를 포함한 모든 세포를 10 mm 세포배양접시에 2×10^8개가 되도록 고르게 분산시키고, 1% antibiotic-antimycotic 용액(Invitogen, USA) 및 10% FBS(Invitrogen, USA)가 첨가된 DMEM(Invitrogen, USA)을 이용하여 세포배양을 시행하였다. 3일 경과 후 floating cell을 제거하고 배지를 교환하며, 이후 3일 간격으로 배지를 교환하였다. 세포가 semi-confluent해지면 계대배양을 시행하며, 배지에 3 ng/ml FGF-2를 추가하였다[14].

치조골유래의 세포를 얻기 위해, 발치치아의 발치와를 통해 치조골 골수의 세포를 흡입하여 장골골수유래 줄기세포와 동일한 방법으로 분리, 배양을 시행하였다.

분리, 배양한 3종류의 성견 성체줄기세포를 유래한 조직의 이름에 따라 치주인대줄기세포(PDLSC), 치조골줄기세포(ABSC) 및 골수줄기세포(BMSC)로 표시하였다.

2. 세포분화능 관찰

분리, 배양된 각각의 세포를 이용하여 골세포, 지방세포, 연골세포로의 분화능을 관찰하였다.

1) 골세포로의 분화능 관찰

조골세포로의 분화가능성을 관찰하기 위하여 석회화결절 형성능을 관찰하였다. 1% antibiotic-antimycotic 용액, 15% FBS, 10 mM sodium β-glycerolphosphate(Sigma, USA), 50 μg/mℓ ascorbic acid(Sigma, USA), 50 nM dex-

amethasone(Sigma, USA) 이 첨가된 DMEM을 배지로 사용하여 1×10^4 세포를 24 well plate에서 14일 동안 배양하였다. 배양 시 습도는 100%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2를 계속 공급하였다. 세포들을 0.1% Alizarin Red S 용액(pH 4.2)으로 염색한 후 석회화 결절양상을 광학현미경하에서 관찰하였다.

2) 지방세포로의 분화능 관찰

지방세포형성능을 관찰하기 위하여 2×10^4 세포를 8 well chamber slide에 접종한 후 1% antibiotic-antimycotic과 10% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하였다. 세포가 밀생 배양 될 때까지 7일 동안 추가로 배양하였으며, 그 이후 10% FBS, 1 uM dexametasone, 0.5 mM methyl-isobutylxanthine, 10 ug/ml insulin, 10 mM indomethacin, 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM(지방세포 분화유도 배지)에서 3일, 10 ug/ml insulin, 10% FBS, 1% anti-biotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM(지방세포 분화유지 배지)에서 1일 동안 배양을 하였으며, 이것을 3회 반복하였다. 이후 지방세포 분화유지 배지에서 추가로 7일 동안 배양하였다. 배양 시 습도는 100%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2를 계속 공급하였다. 세포들을 10% 중성 포르말린에서 30분 동안 고정한 후 Oil Red O (Sigma, USA)로 염색을 시행하였고 광학현미경하에서 세포의 분화 양상을 관찰하였다.

3) 연골세포로의 분화능 관찰

연골화 분화능을 관찰하기 위하여 1.2×10^5개의 세포를 5 ml의 StemXVivo Chondrogenic Base Media(R&D Systems, USA)에서 잘 풀어준 후 200 xg에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다. 세포를 다시 0.5 ml StemXVivo 연골세포 분화용 배지(R&D systems, USA)에 잘 풀어준 후 200 xg에서 5분 동안 실온에서 원심분리하여 펠렛을 형성시켰다. 배지를 제거하지 않은 채로 15 ml conical tube(SPL, Korea)에서 28일 동안 배양을 하였으며 2~3일에 한 번씩 0.5 ml StemXVivo 연골세포 분화용 배지로 갈아주었으며, conical tube의 뚜껑을 살짝 덮어 가스의 공급이 원활하도록 하였다. 배양 시 습도는 100%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2를 계속 공급하였다. 배양이 끝난 후 세포들을 10% 중성 포르말린에서 30분 동안 실온에서 고정한 후 70, 80, 95%의 알코올에서 각각 탈수를 시행하고 Esosin으로 세포를 염색하였다. 다시 100% 알코올에서 탈수를 시행한 후 xylene에서 투명화 시켰고, paraffin으로 포매하였다. 포매된 세포들을 마이크로톰으로 4 um의 두께로 자른 후 염색을 시행하였다. 파라핀을 제거한 후 1% Alcian blue(Fluka, USA) 용액에서 염색한 후 nuclear fast red(Merck, Germany)로 대조염색하고 광학현미경하에서 관찰하였다.

3. 표지인자 발현 관찰

유세포분석기(Flow Cytometry)를 이용한 표지인자 발현 관찰을 위해 3~5계대의 각각의 세포를 약 1×10^6개씩 준비하였다. 관찰하고자 하는 표면항원에 대한 형광염색소(fluorescent dye)를 가지는 일차 항체, 이차 항체를 처리한 후 FACSCalibur(Becton Dickinson, US)를 이용하여 분석하였다.

초기 중배엽줄기세포(MSC)의 표지인자로 알려져 있는 표면항원 CD146, STRO-1, CD44, CD90 및 백혈구(leukocyte)나 조혈세포(hematopoietic cell)의 표면항원인 CD45, CD34의 발현여부를 분석하였으며 사용한 면역항체 염색법과 항체는 다음과 같다.

CD44의 발현은 anti-mouse/human CD44 antibody (BioLegend, USA), CD45는 rat anti canine CD45 anti-body(abD Serotec, UK) 그리고, CD34은 mouse anti ca-nine CD34 antibody(abD Serotec, UK)의 일차 항체만을 이용하는 직접 면역형광 염색법을 사용하여 분석하였다.

CD146, STRO-1, CD90은 이차 항체를 이용하는 간접 면역형광 염색법을 이용하였다.

CD146의 발현을 관찰하기 위해서 mouse anti CD146 antibody(abcam, UK)를 처리한 후 goat anti mouse IgG antibody(Jackson ImmunoResearch, USA)로 이차처리 하였으며, STRO-1의 발현은 mouse anti STRO-1 antibody (R&D systems, USA)를 일차 항체로 이용하고 goat anti mouse IgM-Alexa 488(Invitrogen, USA)를 이차 항체로 사용였다. CD90의 발현은 rat anti dog THY1 CD90 anti-body(abD Serotec, UK)를 일차 처리한 후 rabbit anti rat IgG(abcam, UK)을 이용하여 이차 처리하였다.

4. 누드 마우스 피하의 세포이식

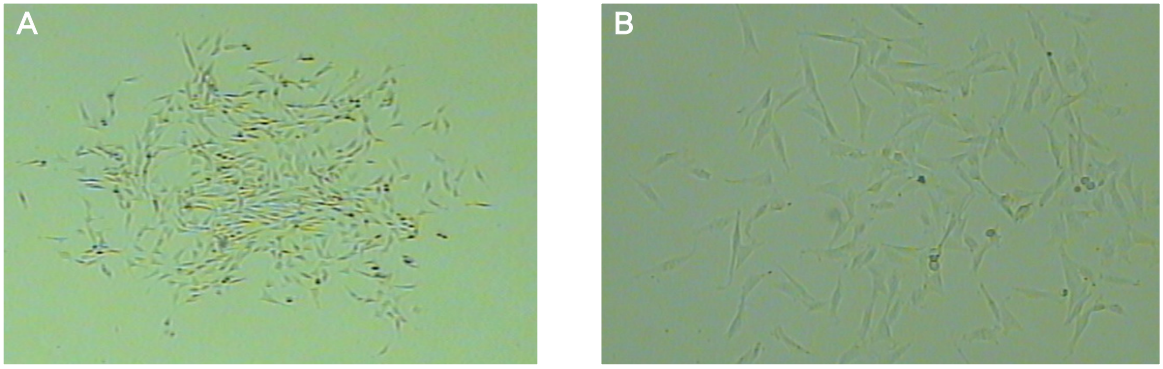

Figure 1. The cultured canine PDLSCs form adherent clonogenic cell clusters of fibroblast-like cells (A) Colony forming Unit (Original magnification x40) (B) typical fibroblast-like cells (Original magnification x100).

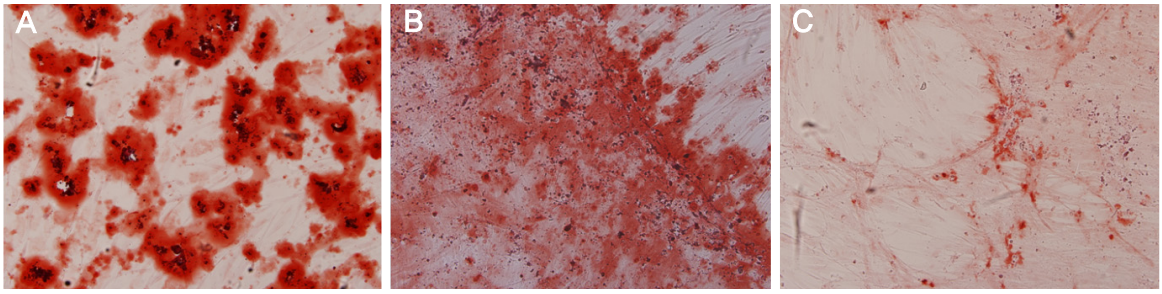

Figure 2. Osteogenic differentiation (A) PDLSC (B) ABSC (C) BMSC (Alizarin red S, Original magnification x100).

배양된 2종의 성견 치계줄기세포(PDLSC, ABSC)와 골수유래 줄기세포(BMSC), 총 3종류의 세포를 세포 전달체(carrier)에 부착시킨 후 하루 동안 배양하고, 누드 마우스의 피하에 이식하였다. 세포의 생체이식을 위한 전달체로서 hydroxyapatite / β-tricalcium phosphate(HA/TCP) 골이식재(Osteon™, IMPLANTIUM, Korea)를 사용하였다. 1×10^6의 각 세포를 50 mg의 HA/TCP 전달체와 함께 배양하였으며, 전달체에 세포가 잘 부착되었는지 확인하기 위해 각 시료를 고정, 탈수 및 gold-palladiumcoating을 시행한 후 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, S-4700, Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

세포를 첨가하지 않고 전달체 만을 이식한 것을 대조군으로 하고, 분리한 3종류의 세포를 각각 붙인 것을 실험군으로 하여 4개의 군으로 구성하였다. 생후 6~8주된 3마리의 athymic 누드 마우스(BALB/c-nu)를 준비하고, 복강 내로 ketamine과 xylazine을 2:1로 50 ul 혼합 투여하여 전신마취를 유도한 후, 등 피부에 약 5 mm 절개를 가하고 수술용 가위를 이용하여 4부위 피하에 주머니 형태의 공간(pouch)을 만들었다. 각각의 주머니 공간에 준비해 둔 전달체 혹은 각군의 세포/전달체를 이식하고 피부를 봉합하였으며, 이식 8주 후에 희생하여 비탈회 조직표본을 제작하고, basic fuchsin과 methylene blue 용액(Multiple stain solution, Polysciences, PA, USA)으로 염색을 한 후, 현미경을 이용하여 이소성 골형성 유무와 조직 반응을 관찰하였다.

본 연구는 서울대학교 실험동물 자원관리원의 동물실험위원회의 사전승인을 받았다(SNU-070612-3, SNU-080324-3).

결과

1. 세포분화능 관찰

분리, 배양한 3종류의 성견 성체줄기세포(PDLSC, ABSC, BMSC)의 세포분화능을 평가하였다. 배양된 각각의 세포는 배양접시에 부착되어 집락(colony)을 형성하며 성장하였으며, 광학현미경을 이용한 관찰에서 전형적인 섬유아세포의 형태를 보였다(Fig. 1).

조골세포로의 분화능을 관찰하기 위하여 석회화결절형성능을 관찰하였다. Alizarin red S로 염색한 경우 골세포 분화용 배지에서 자란 실험군 세포에서는 세 가지 세포 모두

에서 밀생 배양된 세포와 함께 붉게 염색된 석회화 결절이 관찰되었다(Fig. 2). 일반배지에서 자란 세포에서는 석회화 결절이 관찰되지 않았다. 지방세포로의 분화능은 oil red O 염색을 통하여 확인하였다. 지방세포 분화유도용 배지에서 배양된 세포를 oil red O로 염색한 결과 염색된 지방이 축적된 세포가 관찰되었다(Fig. 3). 일반배지에서 배양된 세포를 동일한 염색을 시행한 결과 지방이 축적된 세포들이 관찰되지 않았다. 연골화 분화능 관찰은 28일 동안 세포를 연골세포 분화용 배지에서 배양한 후 alcian blue로 염색하여 관찰하였다. 세 가지 세포 모두 연골 형태의 세포로 분화를 관찰할 수 있었지만 PDLSC군의 경우 다른 군 보다 연골분화가 약하게 나타났다(Fig. 4).

2. 줄기세포 표지인자 발현 관찰

성견에서 분리 배양한 세 종류의 성체줄기세포 특성 파악을 위하여 유세포분석을 시행하였다. 표면항원 CD146, STRO-1, CD44, CD90 및 백혈구(leukocyte)나 조혈세포(hematopoietic cell)의 표면항원인 CD45, CD34의 발현 여부를 분석하였다. PDLSC의 경우 99% 이상 거의 대부분의 세포에서 CD44, CD90 표면항원이 관찰되었으며, STRO-1은 0.25%로 소수의 세포에서만 나타났다(Fig. 5).

ABSC 및 BMSC의 유세포분석 결과는 PDLSC과 비슷한 양상을 보였으며, ABSC의 경우 CD146는 38.97%, CD45는 9.56%, CD34는 7.20%로 다른 세포보다 조금 높은 발현을 보였다(Fig. 6). BMSC의 경우에는 STRO-1이 3.02%로 다른 두 세포보다는 높은 발현율을 보였다(Fig. 7).

3. 누드 마우스 피하에서의 이소성 골형성능

누드 마우스 이식 전, 주사전자현미경을 이용하여 HA/TCP 전달체에 세포가 부착된 양상을 관찰하였다. 세포들은 다양한 모양으로 다수의 수지상 세포돌기를 내면서 HA/TCP 표면에 잘 부착되어 있었다(Fig. 8). 이식 후 8주 후에 누드 마우스를 희생하여 얻은 비탈회 조직표본에서는 세 가지 세포군 모두에서 전달체 주변으로 신생골 침착이 관찰되었으며, 인접 조직의 별다른 염증반응은 관찰되지 않았다(Fig. 9).

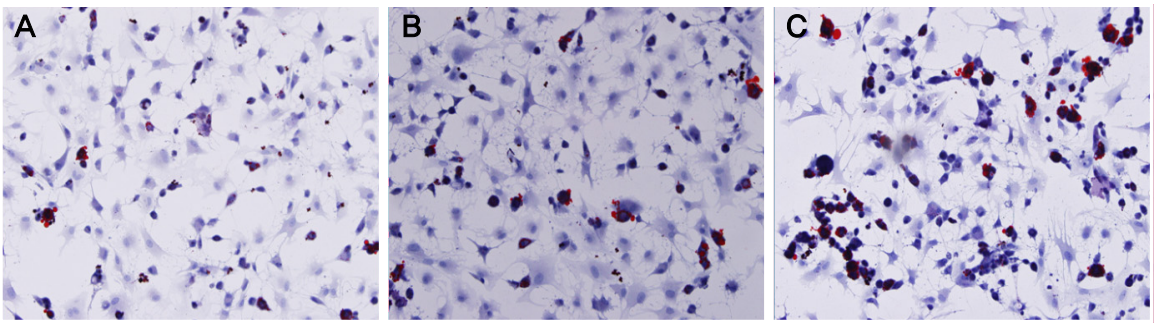

Figure 3. Adipogenic differentiation (A) PDLSC (B) ABSC (C) BMSC (Oil Red O staining, Original magnification x100).

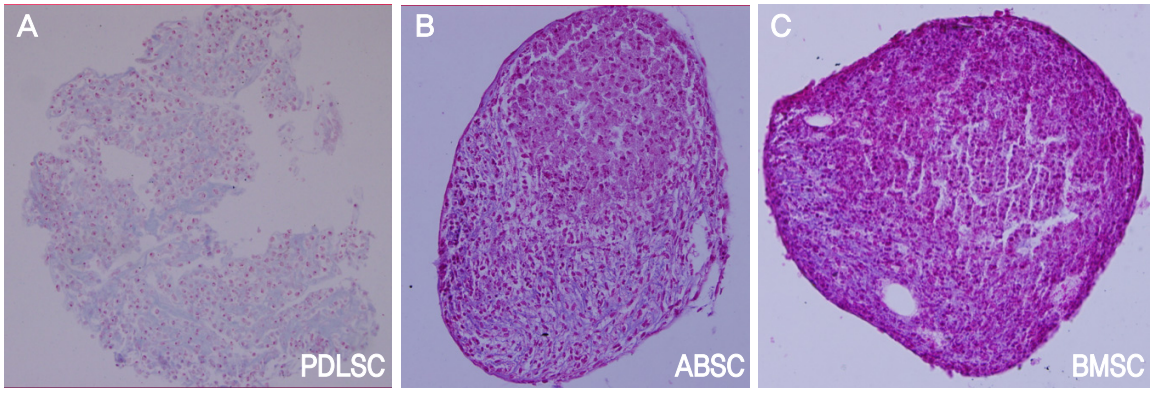

Figure 4. Chodrogenic differentiation (A) PDLSC (B) ABSC (C) BMSC (Alcian Blue staining, Original magnification x200).

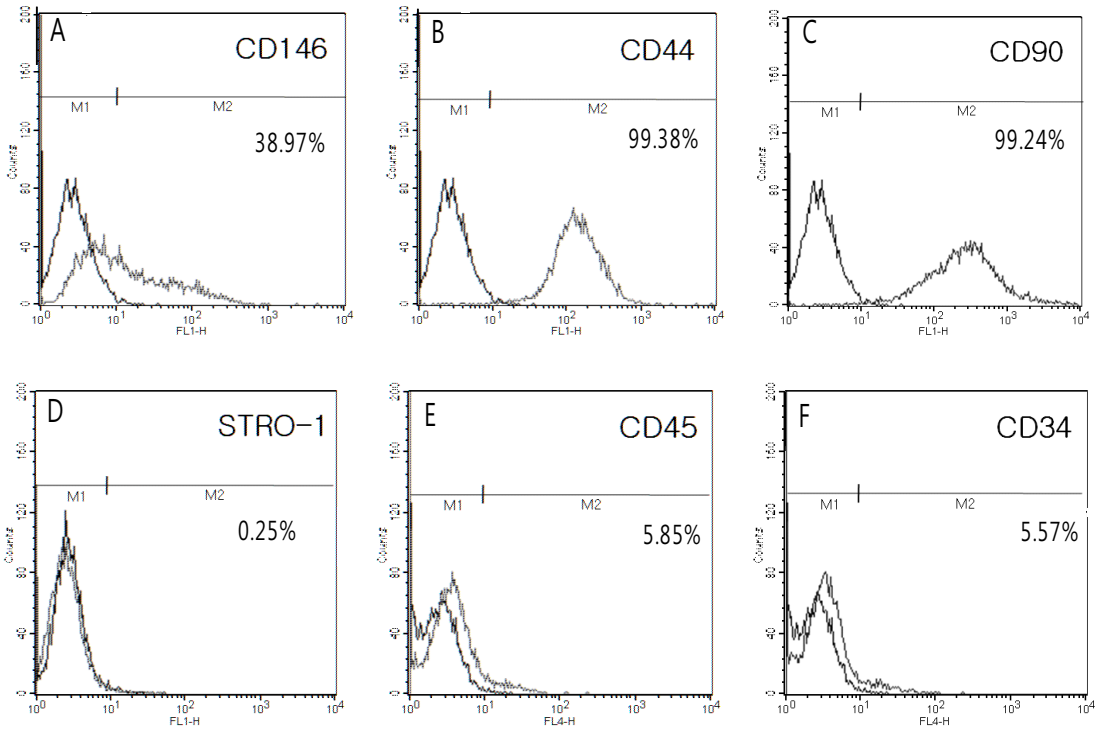

Figure 5. *Flow cytometric analysis of PDLSC(A) 12.96%of PDLSC were positive staining for CD146 (B) 99.76% for CD44 (C) 99.40% for CD90 (D) 0.25% for STRO-1 (E) 5.85% for CD45 (F) 5.57% for CD34.*

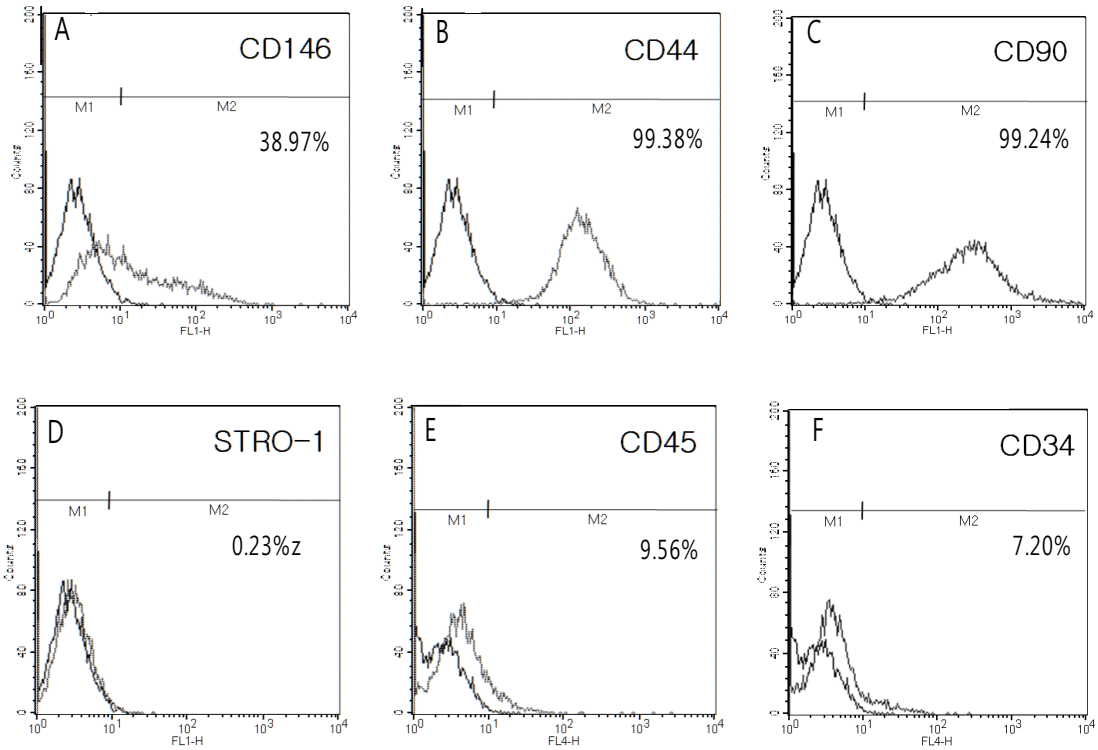

Figure 6. *Flow cytometric analysis of ABSC (A) 38.97% of ABSC were positive staining for CD146 (B) 99.38% for CD44 (C) 99.24% for CD90 (D) 0.23% for STRO-1 (E) 9.56% for CD45 (F) 7.20% for CD34.*

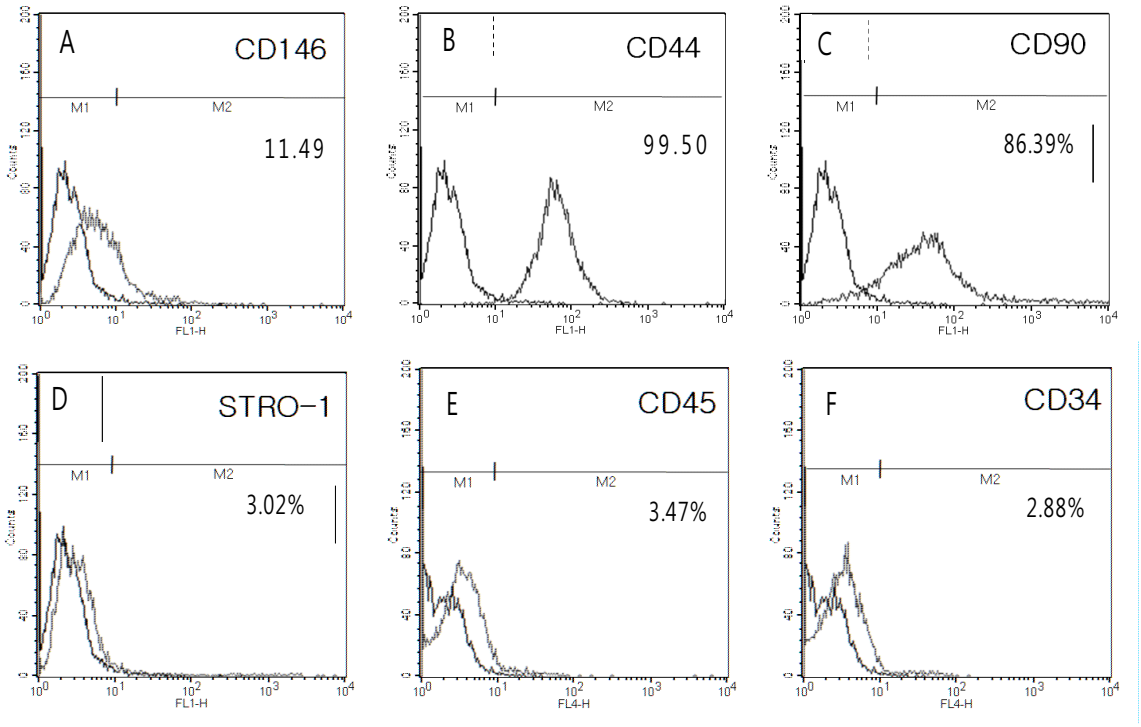

Figure 7. Flow cytometric analysis of BMSC (A) 11.49% of BMSC were positive staining for CD146 (B) 99.50% for CD44 (C) 86.39% for CD90 (D) 3.02% for STRO-1 (E) 3.47% for CD45 (F) 2.88% for CD34.

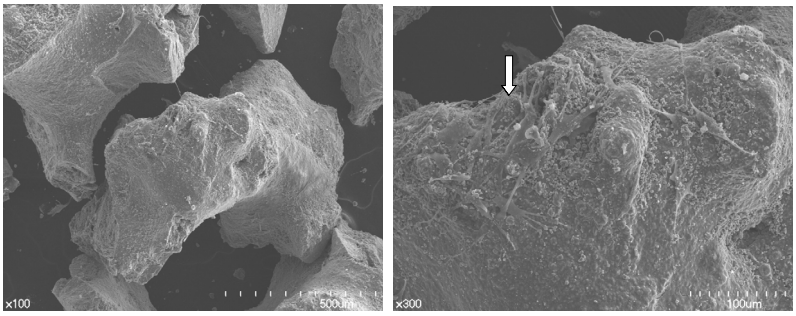

Figure 8. BMSCs attached to HA/TCP. The arrow indicates attached cells (SEM, Original magnification x100, x300).

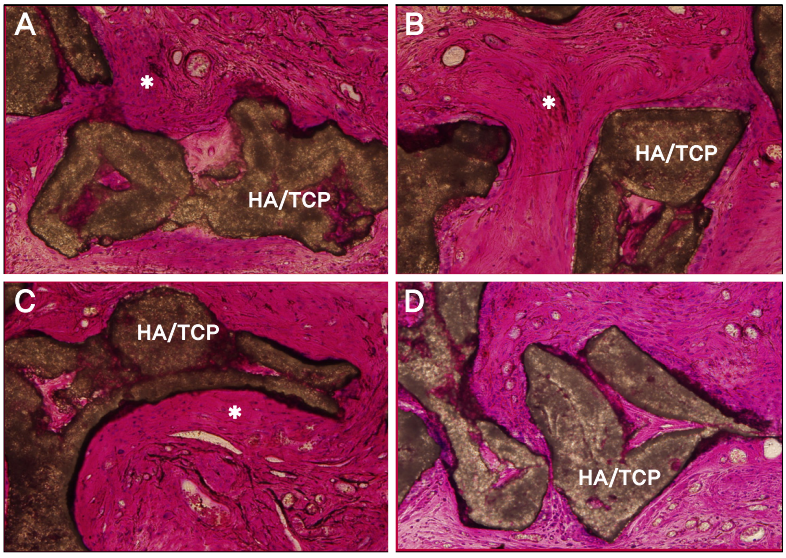

Figure 9. Eight weeks after transplantation. The asterisk(*) indicates new bone formation aroundHA/TCP scaffolds (A) PDLSC (B) ABSC (C) BMSC (D) Control (Multiple staining, Original magnification x200).

고찰

이 연구에서는 성견의 골수 및 치주인대, 치조골에서 분리, 배양된 세포의 줄기세포 특성을 확인하고 유세포분석기를 이용하여 다양한 표지인자의 발현 정도를 확인하였다.

세 군 모두에서 비슷한 양상의 결과를 보였으며, 누드 마우스의 피하이식 결과도 세 가지 세포 모두에서 이소성 골 형성이 관찰되었다.

치주인대세포는 치주조직의 재생, 창상 치유, 유지에 있어서 세포와 세포외기질의 상호작용에 관여하는 가장 중요한 기능을 담당하는 세포이며, 특히 신생치조골 및 신생백악질로 분화가 가능한 다분화성 중배엽 기원의 줄기세포로 알려져 있다. 치주인대세포는 보다 침습적인 골수 채취의 과정 없이 사랑니 발치 등을 통하여 쉽게 획득할 수 있으며, 치주조직 재생에 가장 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 가지고 있어 최근 많은 연구가 이루어지고 있다[9,11,12].

이 연구의 결과, 성견의 구강조직, 특히 치주인대와 치조골에서 유래된 세포도 골수유래 세포와 마찬가지로 집락을 형성하는 자가증식능을 가진 세포의 존재를 확인할 수 있었으며, 분리된 세포들이 골세포, 지방세포, 연골세포로 분화가 가능함이 확인되었다. 이는 이전의 연구에서 사람의 치주인대세포에서 유래한 세포가 골세포나 지방세포로 분화가 가능하다[9,15]는 결과와 일치한다. 이 연구에서는 연골세포로의 분화에 있어서 치주인대 줄기세포의 경우 분화의 정도가 약하였다. 다른 연골세포 분화에 대한 연구결과에서도 치주인대세포에의 연골세포로의 분화가 잘 일어나지 않음이 보고된 바 있으며, 이는 치주인대유래 세포가 다른 줄기세포보다 이미 기능적으로 더 분화된 세포이기 때문이라고 추정되고 있다[12,13,16].

치계줄기세포를 특정 표면항원물질의 발현 여부로 확인하려는 시도가 이루어졌다[8,11,12,17]. 대부분의 연구는 초기 중배엽줄기세포의 표지인자로 추정되고 있는 STRO-1과 CD146/MUC18, CD29, CD44 등이 주로 이용되었으며 발현이 보고되었다. 이번 실험에서는 유세포분석을 통해 초기 중배엽줄기세포의 표면항원인 CD146, STRO-1, CD44, CD90의 발현을 검사하였으며, 백혈구(leukocyte)의 표면항원인 CD45나 조혈세포(hematopoietic cell)의 표면항원인 CD34의 발현여부도 포함하여 총 6종류의 표면항원을 분석하였다. 기존의 연구에서 CD29, CD44, STRO-1, CD106, CD146, CD90 등의 중배엽줄기세포 표면항원을 발현하고 조혈줄기세포의 표면항원인 CD34, CD45가 발현되지 않는 것을 이용한 중배엽줄기세표의 형질 특성연구가 보고되었다[18,19]. 유세포분석을 이용한 이전의 다른 연구에서 돼지의 PDLSC에서 STRO-1 표면항원 발현을 5.6%로 보고하였다[11]. 본 연구에서는 BMSC의 경우 STRO-1이 3.02%로 나타났지만 PDLSC는의 0.25%로 거의 발현하지 않음을 알 수 있었다. STRO-1이 중배엽줄기세포의 초기에만 발현하고 점차 사라진다는 보고가 있으며, 세포 배양액의 차이 및 계대배양의 정도와 종간 차이 등의 원인을 고려해 볼 수 있다. 표면항원의 발현 정도가 다양하게 나타나는 것을 볼 때 분리, 배양한 성체줄기세포들은 여러 가지 다양한 특성의 세포들(heterogenous cell population)로 구성됨을 알 수 있다.

누드 마우스를 이용한 이소성 골형성을 확인하는 실험에서는 전달체를 이용한 세포의 전달방법이 중요하다. 기존의 여러 연구에서는 단순히 배양된 세포를 전달체와 단순히 혼합하여 이식하거나, in vitro상에서 전달체와 세포를 혼합배양하여 이식하는 방법을 이용하였다[20,21]. 이번 실험에서는 이식될 세포의 전달효율을 높이기 위해, 이식 전에 전달체에 세포를 가하고 하루 동안 배양함으로써 세포를 안전하게 전달체에 부착시킨 후 이식하였다. 주사전자현미경 확인결과, 이식될 세포가 HA/TCP 전달체에 잘 부착됨을 확인할 수 있었다. 이는 HA/TCP 전달체가 줄기세포 부착능이 우수하며 줄기세포 이식을 위한 세포 전달체로서 적절함을 보여주는 것이다. 이식 8주 후, 이식된 세포들은 전달체 주변으로 활발한 신생골을 형성함이 관찰되었다. 세포들간의 골형성능에는 별다른 차이 없이 비슷한 양상을 보였다. 이는 치계 줄기세포(PDLSC, ABSC)도 골수유래의 줄기세포(BMSC)와 같은 골 형성능을 보임을 의미하는 것이다.

Hasegawa 등[22]의 연구에서는 BMSC을 치주 결손부위에 이식을 하여 이식된 세포가 치주조직 재생에 관여할 수 있음을 보고하였으며, 형광염색법을 이용하여 이식한 세포가 재생된 부분에 남아있음을 확인하였다. 이식된 세포들이 골 재생에 작용하였음을 정확히 확인하기 위해서는 골재생과 이식세포의 단순한 존재 유무뿐만 아니라, 이식부위에서 이식세포의 거동과 활성에 관한 추가적인 추적 확인이 필요하다.

이 연구결과 성견의 치주인대, 치조골에서 분리 배양된 세포는 골수에서 분리된 세포와 마찬가지로 성체줄기세포의

특성을 가지며, 초기 중배엽줄기세포 표면항원을 발현하는 다양한 세포들로 구성되어 있음이 확인되었다. 또한 전달체와 함께 누드 마우스 피하에 이식하였을 때 이소성 골형성을 유도하는 능력을 보여주었다. 이러한 결과는 성견의 치주인대 및 치조골에 성체줄기세포가 존재함을 확인하는 것으로, 줄기세포 이식연구에서 성견을 이용한 동물실험모델 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 향후 치조골 결손부의 재생 실험을 통해 각 세포간의 골형성능력과 특성 차이에 대한 추가적인 확인이 필요하며, 보다 특징적인 표지인자의 발견과 분리 배양 방법의 개선으로 단일 특성의 세포를 얻어 비교 분석하는 연구가 요구된다. 또한 골결손부에서의 이식연구를 위해서는, 이식된 세포의 작용과 활성을 정확히 확인할 수 있는 믿을만한 세포추적 및 활성 표시자에 대한 연구개발이 선행되어야 하겠다.

참고문헌

1. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of “stemness”. Exp Hematol 2004;32:585-598.
2. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. Cell 2004;116:639-648.
3. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. Nature 2001;414:118-121.
4. Fuchs E, Tumbar T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. Cell 2004;116:769-778.
5. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Invest 2006;116:1195-1201.
6. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autogenous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J Bone and Joint Surg 1998;80-A:985-996.
7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. Tissue Engineering 2005;11:1198-1211.
8. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. J Periodontol 2004;75:1281-1287.
9. Seo BM, Miura M, Gronthos S et al.Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004;364:149-155.
10. Matsunara T, Suardita K, Ishii M et al. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and Iliac bone marrow stromal cells. J Bone Miner Res 2005;20:399-409.
11. Liu Y, Zheng Y, Ding G et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. Stem Cells 2008;26:1065-1073.
12. Kim KH, Kim SH, Seol YJ, Lee YM. Stem cell properties of cells derived from canine periodontal ligament. J Korean Acad Periodontol 2007;37:479-488.
13. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. Bone 1997;21:225-235.
14. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. Biochem Biophys Res Commun 2001;288:413-419.
15. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res 2006;41:303-310.
16. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. J Dent Res 1986;65:12-22.
17. Jo YY, Lee HJ, Kook SY et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. Tissue Engineering 2007;13:767-773.
18. Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I. Isolation and characterization of stem cell clones from adult human ligament. Tissue Engineering Part A 2009;[Epub ahead of print].
19. Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. Oral Diseases 2006;12:358-363.
20. Lee YM, Seol YJ, Lim YT et al. Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. J Biomed Mater Res 2001;54:216-223.
21. Park DJ, Choi BH, Zhu SJ et al. Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2005;33:50-54.
22. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. J Periodontol 2006;77:1003-1007.