

# 치수, 치주인대 및 치낭에서 얻어진 성체줄기세포의 조골세포로의 분화능력 평가에 관한 연구

이중규 · 이재훈

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2010;36:7-15)

## A study on differentiation potency of adult stem cells from pulp, periodontal ligament, and dental follicle to osteoblast

Joong-Kyou Lee, Jae-Hoon Lee

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University*

Complex human tissues harbor stem cells and precursor cells, which are responsible for tissue development or repair. Recently, dental tissues such as dental pulp, periodontal ligament (PDL), dental follicle have been identified as easily accessible sources of undifferentiated cells.

These tissues contain mesenchymal stem cells that can be differentiated into bone, cartilage, fat or muscle by exposing them to specific growth conditions. In this study, the authors procured the stem cell from pulp, PDL, and dental follicle and differentiate them into osteoblast and examine the bone induction capacity.

Dental pulp stem cell (DPSC), periodontal ligament stem cell (PDLSC), and dental follicle precursor cell (DFPC) were obtained from human 3rd molar and cultured. Each cell was analyzed for presence of stem cell by fluorescence activated cell sorter (FACs) against CD44, CD105 and CD34, CD45. Each stem cell was cultured, expanded and grown in an osteogenic culture medium to allow formation of a layer of extracellular bone matrix. Osteogenic pathway was checked by alizarin red staining, alkaline phosphatase (ALP) activity test and RT-PCR for ALP and osteocalcin (OCN) gene expression.

According to results from FACs, mesenchymal stem cell existed in pulp, PDL, and dental follicle. As culturing with bone differentiation medium, stem cells were differentiated to osteoblast like cell. Compare with stem cell from pulp, PDL and dental follicle-originated stem cell has more osteogenic effect and it was assumed that the character of donor cell was able to affect on differential potency of stem cell. From this article, we are able to verify the pulp, PDL, and dental follicle from extracted tooth, and these can be a source of osteoblast and stem cell for tissue engineering.

**Key words:** Stem cells, Osteoblasts, Dental pulp, Periodontal ligament (PDL), Dental follicle

(원고접수일 2009. 12. 18 / 1차수정일 2009. 12. 30 / 2차수정일 2010. 1. 20 / 게재확정일 2010. 1. 29)

## I. 서 론

줄기세포(stem cell)의 발견은 1956년 방사선을 조사하여 혈액 순환계가 파괴된 쥐에 건강한 쥐의 골수를 이식하여 생명을 되살린 실험으로 알려졌다. 이식된 건강한 쥐의 골수는 방사선이 조사된 쥐의 혈액 순환계를 복원시켰으며, 지라에 생착되어 제기능을 수행하였다<sup>1</sup>. 줄기세포란 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 분화 자극과 환경의 조절로 여러 다른 분화과정을 거칠 수 있다. 이러한 줄기세포는 여러 형태의 세포로 분화할 수 있으며<sup>2</sup>, 크게 두 가지로 구분되는데 발생 초기의 배반포(blastocyst)의 내부 세포괴(inner cell mass)에서 얻

어지는 배아줄기세포(embryonic stem cell)와 발생이 끝난 태반이나 성인에서 얻을 수 있는 성체줄기세포(adult stem cell)로 나뉜다<sup>3</sup>. 인간의 줄기세포 연구에 있어서 난자와 체세포의 핵이식을 필요로 하는 배아줄기세포보다 성체에서 얻어 분화시킬 수 있는 성체줄기세포가 윤리적, 비용적 문제에 있어 향후의 연구에 주도적 역할을 할 것이라는 의견이 지배적이다<sup>4</sup>.

성체줄기세포는 조직이나 기관의 분화된 세포들 사이에서 발견되는 미분화 세포로 스스로 증식할 수 있으며, 특수한 기능을 보유하는 세포로 분화할 수 있는 능력이 있어 세포의 특성을 유지하고, 손상된 세포가 있으면 치료하는 역할을 한다. 성체줄기세포는 mesenchymal stem cell (MSC)와 hematopoietic stem cell (HSC)로 나눌 수 있으며, 대표적인 예로 골수로부터 분리할 수 있는 골수유래 줄기세포와 제대혈 내의 조혈모세포가 있으며, 이러한 성체줄기세포의 분화 다양성은 배아줄기세포만큼 크지는 않으나, 특정 배양조건을 조절함으로써 골모세포(osteoblast), 연골모세포(chondroblast), 근육모세포(myoblast), 그리고 신경세포

### 이재훈

330-714 충남 천안시 안서동 29

단국대학교 치과대학 부속병원 구강악안면외과

Jae-Hoon Lee

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

29 Anseodong, Choengan, Chungnam, 330-714, Korea

Tel: +82-41-550-1991~3 Fax: +82-41-551-8988

E-mail: lee201@dankook.ac.kr

(nerve cell) 등으로 분화가 가능성이 밝혀졌다<sup>5</sup>. MSC는 배양액 내의 cytokine을 조절하여 중배엽계 세포인 골모세포나 연골모세포로 분화할 수 있으며, TGF- $\beta$ 를 첨가하여 연골세포를, dexamethasone이나  $\beta$ -glycerolphosphate, ascorbic acid를 혼합하여 골모세포로 분화시킬 수 있다<sup>6</sup>. 줄기세포의 치료가 각종 난치병 치료에 큰 희망이 되고 있는 것은 사실이지만 세포 채취 중의 감염우려, 세포분화 조절능력 상실로 인한 암 발생 우려 등 아직까지 풀리지 않은 몇 가지 난제로 인해 임상실험은 초보적 단계에 머무르고 있다.

제3대구치는 치과진료 중 비교적 쉽게 얻을 수 있는 치아로 주로 배목되어있는 형태로 10대 후반에 미성숙 상태로 제거된다. 제3대구치 발거 시 얻을 수 있는 세포 성분으로는 치수강 내의 pulp와 치근에서 얻을 수 있는 periodontal ligament (PDL), 치아의 치관부를 둘러싸고 있는 dental follicle이 있다. 미성숙한 제3대구치일수록 pulp나 PDL, dental follicle의 채취가 용이하며 이러한 세포성분 중 pulp와 PDL에서 stem cell이 존재하는 것으로 확인되었으며 실험적으로 분리가 되었고 여러 가지 분화실험을 거치고 있는 단계이다<sup>7,8</sup>. Dental follicle의 경우 치아의 맹출 단계에서 치주조직으로 분화하는 특성을 갖고 있으며 이러한 치아기원의 조직들에서 성체줄기세포를 얻어 osteoblast를 분화시킬 수 있다면 현재 활발히 연구가 진행되는 골수기원 간엽줄기세포와는 다른 기원의 골형성을 일으킬 수 있는 세포인자를 얻을 수 있다고 생각된다.

이에 본 논문은 일반적인 치과치료 시 쉽게 얻을 수 있는 제3대구치에서 인간의 pulp, PDL, dental follicle을 얻어 이로부터 성체줄기세포를 분리, 배양하고, 각 줄기세포를 골모세포로 분화시켜 세포의 분화 능력을 평가하여 향후 줄기세포를 이용한 골형성 조직공학 연구에 기초를 제공하고자 시행하였다.

## II. 대상 및 방법

### 1. Pulp, PDL, dental follicle의 채취

감염되거나 우식증이 없는 미성숙 제3대구치를 갖는 환자 8명에게 informed consent를 주고 동의를 구한 후 조직채취를 시행하였다.(Table 1.) 구강 내를 chlorhexidine 용액으로 소독하고 통상적인 방법으로 치아를 발거한 후 dental high speed drill을 사용하여 치수강을 노출시켰다. 무균적 상황 하에서 curette나 explorer를 사용하여 pulp를 조심스럽게 꺼내고 치근에서 PDL을 육안으로 확인한 후, 15번 blade와 tissue forcep을 사용하여 PDL을 채취하였다. 미성숙 제3대구치의 경우 발거 시 얻어지는 치관을 15번 blade와 tissue forcep을 이용하여 치아와 분리하고 각각 얻어진 3종류의 조직은 세포의 손실을 최소화하기 위해 1% antibiotic & antimycotic (Gibco BRL)이 포함된 phosphate-buffered salines (PBS) (Gibco BRL)에 담아 실험실로 보냈다.

**Table 1.** Characteristics of samples. Sample number, sex and age, location of extracted teeth, and remark.

Sample	Sex/Age	Extracted tooth	Remark
1	F/21	#18, #48	Pulp, PDL, Dental follicle
2	F/22	#28, #38	Infection
3	M/26	#18, #48	Pulp, PDL
4	M/28	#18, #48	Pulp, PDL
5	F/25	#18, #48	Pulp, PDL
6	M/20	#48	Pulp, Dental follicle
7	F/18	#28, #38	Pulp, PDL, Dental follicle
8	M/30	#18, #48	Pulp, PDL

(PDL: periodontal ligament)

### 2. 세포의 분리 및 배양

Pulp, PDL, dental follicle에서 얻은 각각의 조직 내에서 stem cell을 추출하기 위해 조직을 antibiotic & antimycotic이 포함된 PBS로 세척하고 잘게 자른 후 3 mg/mL의 type I collagenase와 4 mg/mL의 dispase로 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에 1시간 동안 보관하였다. 70  $\mu$ m falcon strainer로 걸러 각각의 조직세포가 아닌 조직을 걸러내고 필터를 빠져 나온 세포를 추출해 항온배양기에서 배양하였다. 배지는 48시간 후부터 교체하기 시작하여 2-3일에 한 번씩 바꾸어 주었으며, 배양용기에 부착되지 않는 부유물들은 배지 교체 시 같이 씻어냈다. 용기의 바닥에 부착된 세포가 70% 정도 포화상태에 이르렀을 때 trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 세포를 분리시킨 후, 계대배양 하여 pulp, PDL, dental follicle의 세포군을 얻어냈다.

### 3. Fluorescence activated cell sorter (FACs)를 이용한 줄기세포의 확인

각각 얻어진 3개의 세포군이 간엽조직에서 비롯하는 성체 줄기세포로서의 역할 가능성이 있는 세포인지 확인하기 위하여, 림프구 줄기세포 표면표지자 CD34, 조혈줄기세포 표면표지자인 CD45와 간엽줄기세포 표면 표지자인 CD44, CD105에 대한 fluorescence activated cell sorter (FACs)를 수행하였다. FACs를 위해 각 세포들을 원심분리(10분, 1000 RPM)하여 세포들을 응집시키고 세척한 후 제조사의 지시에 따라 10  $\mu$ L의 항체에 배양하였으며 줄기세포 표면표지자인 CD34, CD45와 CD44, CD105를 사용하여 배양 15-22일 사이에 FACsCalibur 110 VAC 4 color with sorter sensor unit flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain view, CA, USA)를 이용한 유세포 분석을 시행하였다.

### 4. 골분화 유도

각 줄기세포의 골모세포로의 분화유도를 평가하기 위해

pulp, PDL, dental follicle에서 얻어진 줄기세포를 배지에 따라 대조군(일반 배지)과 실험군(골분화 배지)으로 나누어 배양하였다. 실험군은 골분화를 유도하기 위해, 2-3회 계대 배양된 세포를 사용하여 골분화 배지(1 mL  $\alpha$ -MEM에 10% fetal bovine serum (FBS), 0.1 mM dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.05 mM 2P-ascorbic acid와 2 mM L-Glutamine을 첨가)에서 배양하고, 이 배양액을 3일에 1회씩 교환해주며 70%의 세포 포화도를 보일 때까지 배양하면서 광학현미경 하에서 세포의 형태학적 특성을 7일, 14일, 21일 간격으로 관찰하였다. 대조군은 동일한 과정을 일반 배지에서 시행하였다.

### 5. 조직화학적 염색

#### 1) Alizarin red 염색

무기질 결정의 침착 및 생성 정도를 확인하기 위해 alizarin red 염색을 시행하였다. 실험군과 대조군 세포를 실온에서 10% formalin으로 30분간 고정하고, 증류수로 세척한 후 1% alizarin red (Sigma-Aldrich)로 실온에서 30분간 염색한 후, 증류수로 세척하고 air-dry 한 뒤 육안으로 관찰하였다.

#### 2) Alkaline phosphatase (ALP) 활성도 측정

7일, 14일, 21일 배양한 세포를 PBS로 세척하였다. PBS를 제거한 뒤 alkaline phosphatase substrate (alkaline phosphatase yellow (pNPP) liquid substrate system for ELISA (sigma)) 0.5 mL를 넣고 incubation 한 뒤 3 N NaOH로 반응을 중단시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 standard curve (p-nitrophenol standard solution, sigma)를 그려 alkaline phosphatase activity를 계산하였다.

### 6. RT-PCR

Total RNA는 trizol extraction method (invitrogen light tech)를 사용하여 실험군과 대조군에서 공히 채취하였다. 채취된 RNA는 cDNA 합성을 위하여 사용하였으며, RT-PCR premix (Bioneer, m대진, 한국)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 분리한 total RNA를 cDNA로 역전사한 후, primer 쌍을 이용하여 증폭하였다<sup>1)</sup>. ALP와 osteocalcin m (OCN)의 발현을 측정하고, 내부 대조군으로 GAPDH를 사용하였다.

**Table 2.** RT-PCR primer list and sequence.

ALP	forward 5' -CCTCCTCGGAAGACACTCTG-3'
	reverse 5' -AGACTGCGCCTGGTAGTTGT-3'
OCN	forward 5' -GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3'
	reverse 5' -CTGGAGAGGAGCAGAACTGG-3'
GAPDH	forward 5' -CTGTCTTCACCACCATGGAGA-3'
	reverse 5' -CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'

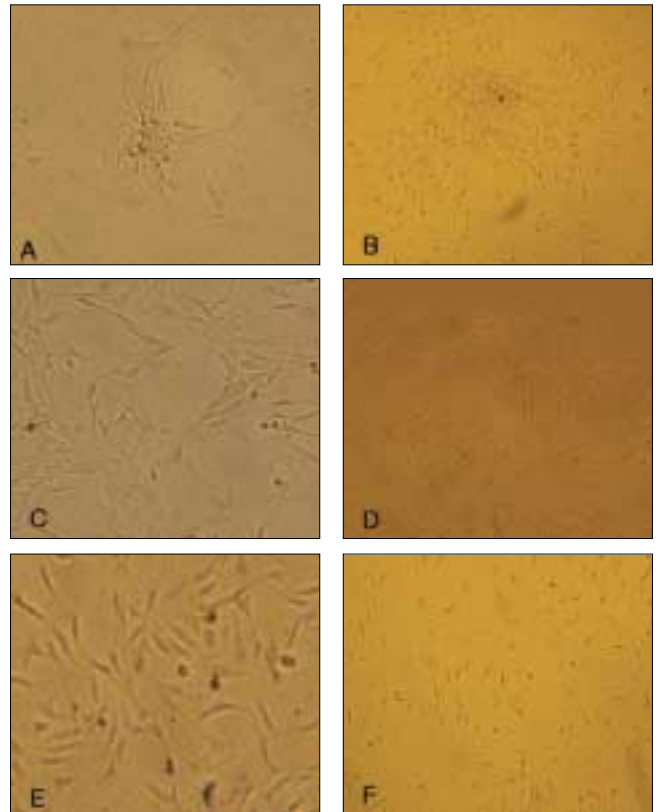
(ALP: alkaline phosphatase, OCN: osteocalcin, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

(Table 2.) PCR의 반응 조건은 94°C에서 5분간 변성한 후, 94°C 1분, 55°C 1분 30초, 72°C 1분간 30주기 실시하고 마지막 주기에서 72°C 5분간 연장하였다. 반응 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV lamp에서 확인하였다.

## III. 연구 결과

### 1. 조직의 채취와 세포의 분리 및 배양

8명의 환자에서 15개의 치아가 채취되었으며, 한 개체에서 얻은 조직 샘플은 줄기세포 분리 단계에서 감염되어 실험에서 배제하였다. 다른 한 개체의 경우 PDL의 채취가 용이하지 않아 pulp만을 채취하였으며, dental follicle의 경우 3개의 개체에서 조직 채취를 할 수 있었다.(Table 1.) 이상의 두 샘플을 제외한 조직을 digestion 시키고 plate에서 배양했을 때, 최초 배양 1-2주 후에 광학현미경 하에서 삼각형이나 방추형 모양을 보이는 섬유세포와 유사한 형태의 세포가 바닥에 부착된 상태로 관찰되었다. 계대배양의 횟수가 늘어감에 따라 세포들은 일정한 방향성을 보이거나 군집을 형성하였다.(Fig. 1.)



**Fig. 1.** Morphology of stem cells from dental tissues.(2-3 passages)

A, B: DPSC (x 200, x 100), C, D: PDLSC (x 200, x 100), E, F: DFPC (x 200, x 100).

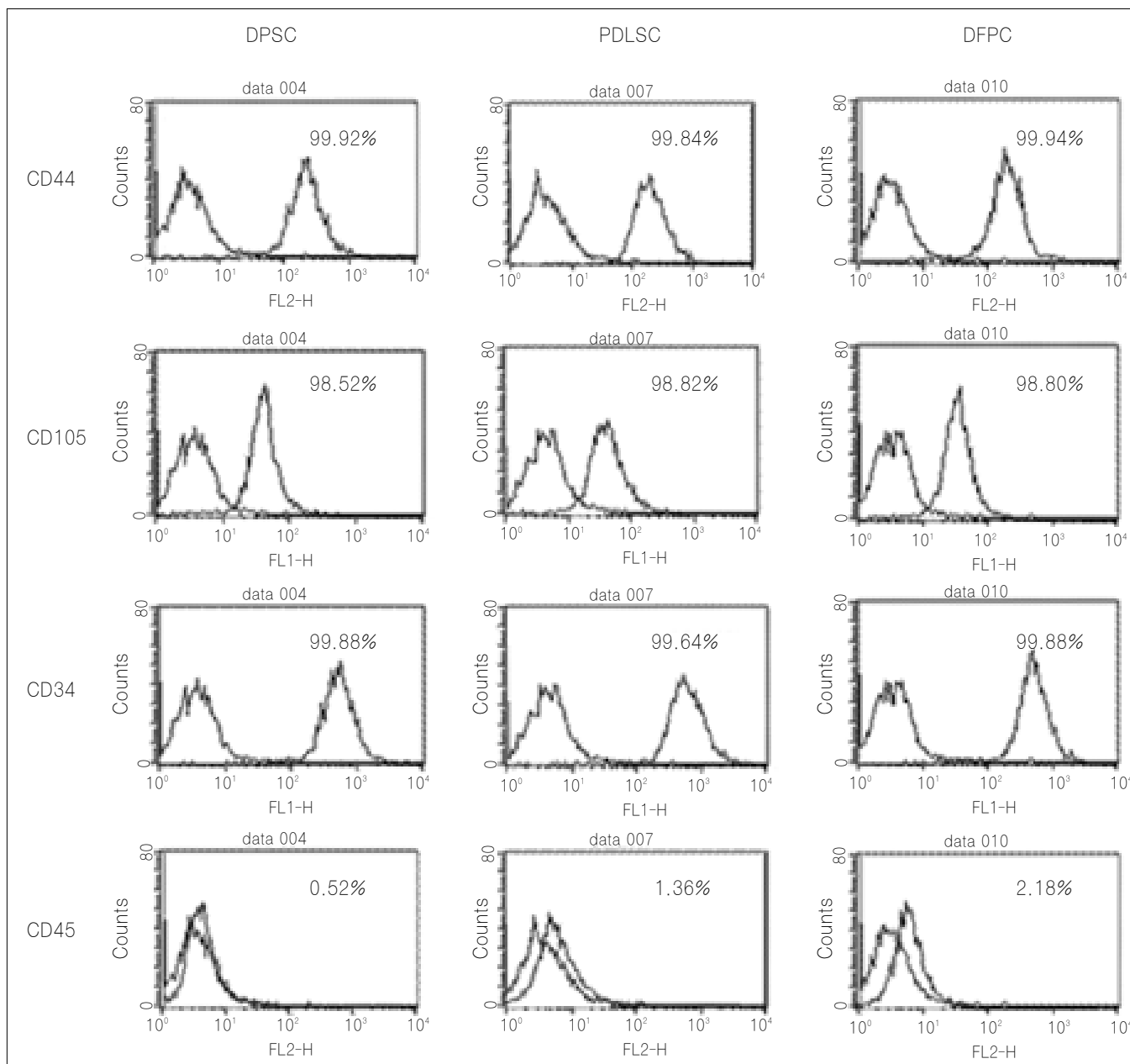
(DPSC: dental pulp stem cell, PDLSC: periodontal ligament stem cell, DFPS: dental follicle precursor cell)

## 2. FACs를 사용한 줄기세포의 확인

Pulp, PDL, dental follicle에서 분리한 세포군집을 FACs를 사용한 유세포분석 결과 Pulp에서 유래된 stem cell (dental pulp stem cell, DPSC), PDL에서 유래된 stem cell (PDL stem cell, PDLSC), dental follicle에서 유래된 전구세포(dental follicle precursor cell, DFPC)에서 모두 CD45에 대한 음성, (0.52%-2.18%) CD44 (99.84%-99.94%), CD105 (98.52%-98.82%)에 대한 양성임을 확인하여 MSC임을 확인하였다. (Fig. 2.)

## 3. 골분화의 유도

골분화 유도 배지를 사용한 실험군과 일반 배지를 사용한 대조군의 세포들은 왕성한 성장을 보였으며 군집을 형성함에 따라 일정한 방향성을 보였다. 광학현미경 하에서 세포는 방추형 모양을 가지는 섬유모세포와 유사한 양상을 보였다.(Fig. 3.)



**Fig. 2.** Characterization of DPSC, PDLSC, and DFPC immunophenotype in vitro. (DPSC: dental pulp stem cell, PDLSC: periodontal ligament stem cell, DFPS: dental follicle precursor cell)

## 4. Alizarin red 염색

DPSC의 경우 7일째에는 실험군과 대조군에서 모두 미약한 반응을 보였으나, 14일부터 실험군의 색상이 진해졌으며, 21일째에는 확연한 차이를 보였다. 대조군에서도 염색의 정도가 진해지기는 했지만, 실험군에 비해서는 정도가 덜했다. PDLSC의 경우 14일까지는 큰 차이가 없었으나 21일째 염색의 차이를 볼 수 있었으며, DFPC의 경우 7일, 14일, 21일에 걸쳐 유의한 차이를 지속적으로 보였다.(Fig. 4.)

## 5. ALP activity test

골형성 초기에 나타나는 ALP를 선별적으로 염색하여 그 흡광도를 이용하여 평가해본 결과, 실험군에서 PDLSC와 DFPC는 7일째 강한 activity를 보였으며, 그 후 일정한 활성도를 보였다. 실험군 DPSC의 ALP activity는 시간에 따라 증가하는 양상을 보였으나 PDLSC와 DFPC의 activity에 비해 유의하게 적었다. 대조군에서는 실험군보다 적은 양의 activity를 보였으며, 역시 DPSC에서 유래된 세포들은 ALP activity가 가장 낮았다.(Table 3., Fig. 5.)

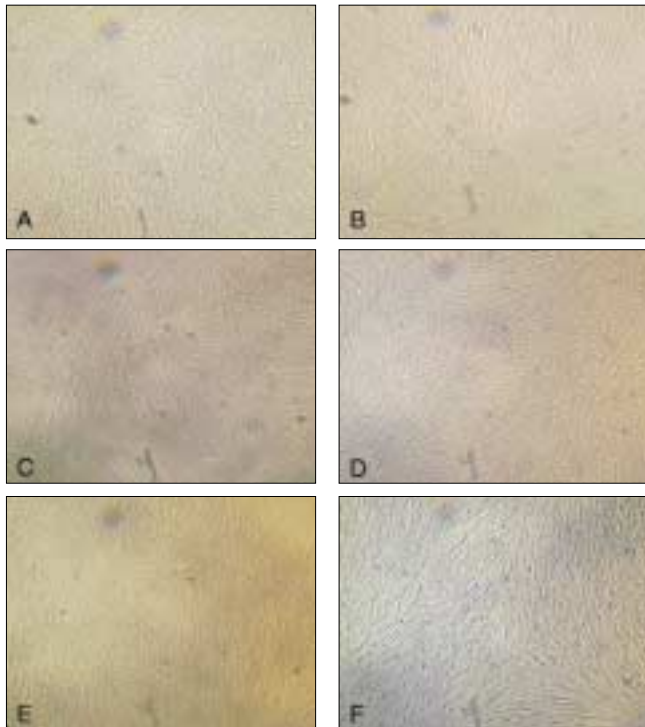
## 6. RT-PCR

ALP에 대한 RT-PCR 결과, 실험군에서 7일째부터 PDLSC와 DFPC는 DPSC보다 강한 band를 나타냈고, ALP가 골화 초기에 발현된다는 점에 있어서는 ALP activity test와 같은 결과로 보인다. OCN의 경우 실험군에서 모두 일정한 band를 나타냈지만, 21일째로 가면서 좀더 명확해지는 양상이 두드러졌다. 샘플의 증폭량이 일정하지 않은 것은 실험상의 일부 오류로 RNA의 분해가 일어나거나 효소반응의 차이로 생겨 일어났다고 생각된다.(Fig. 6.)

**Table 3.** ALP activity test (unit: concentration mM).

Cell	Group	7 days	14 days	21 days
DPSC	Exp	0.064612	0.183676	0.23865
	Control	0.002982	0.005191	0.008953
PDLSC	Exp	0.618275	0.671693	0.683715
	Control	0.193169	0.16455	0.138428
DFPS	Exp	0.640952	0.581677	0.64924
	Control	0.142449	0.144931	0.138428

(ALP: alkaline phosphatase, DPSC: dental pulp stem cell, PDLSC: periodontal ligament stem cell, DFPS: dental follicle precursor cell)



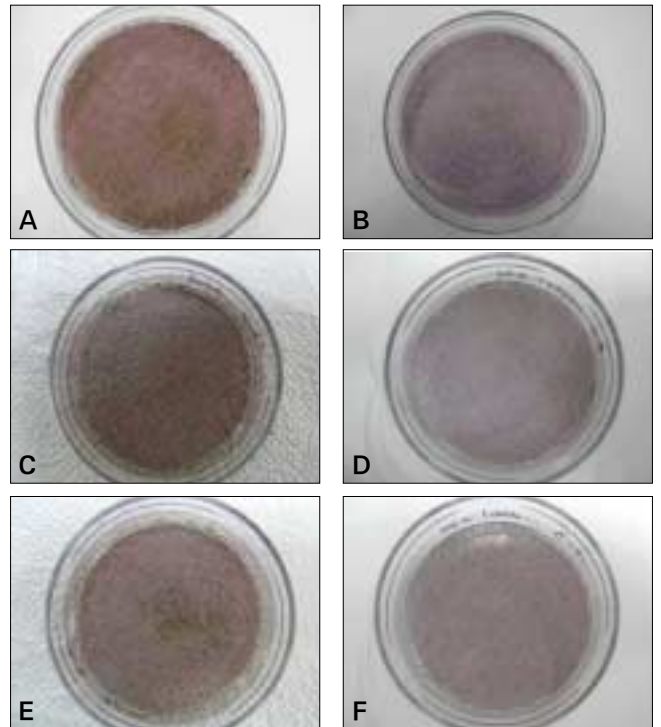
**Fig. 3.** Morphology of cells in osteogenic culture media after 21 days (x 100).

A, C, E: DPSC, PDLSC, DFPC.

In universal culture media after 21 days (X 100).

B, D, F: DPSC, PDLSC, DFPC.

(DPSC: dental pulp stem cell, PDLSC: periodontal ligament stem cell, DFPS: dental follicle precursor cell)



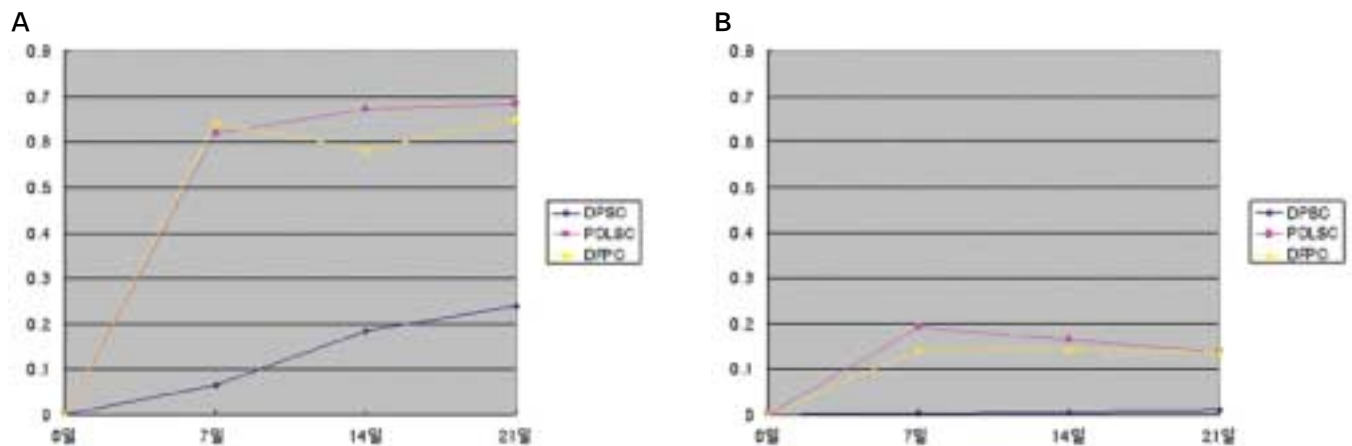
**Fig. 4.** Alizarin red staining of cultured cells in osteogenic media after 21 days.

A, C, E: DPSC, PDLSC, DFPC.

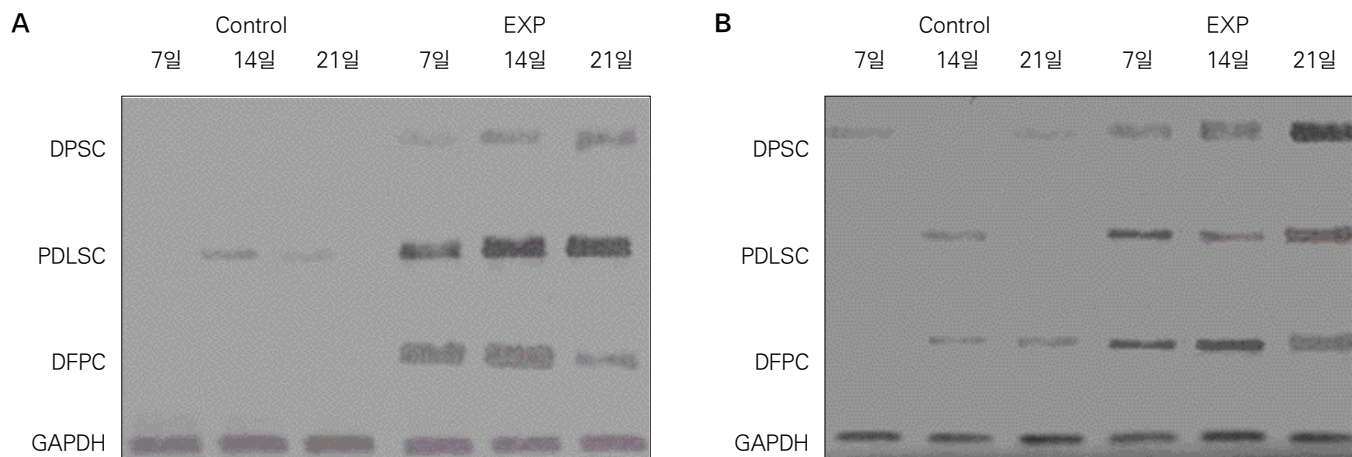
In universal culture media.

B, D, F: DPSC, PDLSC, DFPC.

(DPSC: dental pulp stem cell, PDLSC: periodontal ligament stem cell, DFPS: dental follicle precursor cell)



**Fig. 5.** ALP activity test after 7, 14, 21 days of culture. A: Experimental group (osteogenic media), B: Control group (universal media).  
(DPSC: dental pulp stem cell, PDLSC: periodontal ligament stem cell, DFPC: dental follicle precursor cell)



**Fig. 6.** RT-PCR analysis for expression of osteoblast markers after 7, 14, 21 days of culture (exp: osteogenic media, control: universal media). A: ALP, B: OCN.  
(ALP: alkaline phosphatase, OCN: osteocalcin, DPSC: dental pulp stem cell, PDLSC: periodontal ligament stem cell, DFPC: dental follicle precursor cell, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

#### IV. 고 찰

조직공학은 세포치료와 함께 재생의학에서 가장 중요한 두 개의 축으로 자리잡고 있다. Langer와 Vacanti에 의한 정의에 따르면 조직공학이란 제기능을 수행하지 못하는 장기의 유지, 재생, 대체를 위해 공학과 생명과학이라는 서로 다른 분야가 융합되어 실험실에서 살아있는 조직을 제작하는 분야를 말한다<sup>9</sup>. 조직공학은 생체 내에서 필요한 역할을 수행할 세포와 이를 수용할 수 있는 비계로써의 biomaterial을 필요로 한다. 조직공학에서 줄기세포의 발전에 주목하는 이유는 다른 세포에게는 없는 줄기세포만의 특성 때문이다. 줄기세포가 갖는 큰 2가지의 특성은 딸세포(daughter cell)들이 지속적으로 자신과 같은 특성을 가지는

특성(self-renewal)과, 자신과 다르게 제한된 능력을 갖는 딸세포들을 만들어 최종적으로 이들을 생체 내에서 재집락시키는 분화(differentiation)할 수 있는 특성이다<sup>10</sup>.

이러한 줄기세포는 그 기원에 따라 배아줄기세포와 성체 줄기세포 두 가지 종류로 나뉠 수 있다. 배아줄기세포는 배반포의 내부 세포괴에서 분리가 가능하며, 성체줄기세포는 조직이나 장기에서 얻을 수 있고 mesenchymal stem cell (MSC)과 hematopoietic stem cell (HSC)로 대별된다. 배아줄기세포는 세포치료에 최적화된 세포로 평가받고 있으며, 내배엽, 중배엽, 외배엽에서 유래되는 모든 세포를 재생할 수 있는 강력한 자기 복제능력과 분화능력을 가지고 있다. 하지만 배아줄기세포는 성체가 될 수 있는 배아를 파괴해야만 얻을 수 있다는 점에서 태생적으로 윤리문제를 가지



고 있다고 할 수 있으며, 유전자 변이없는 효과적 배양방법과, 필요한 세포로 정확하게 분화시키는 방법 등이 해결하지 못한 난제로 남아있다.

성체줄기세포는 조직의 손상에 대비하여 조직재생, 치유의 역할을 담당하고 있으며, 배아줄기세포에 비해 시험관 내에서 자라기 힘들고, 분화, 증식능력과 채취할 수 있는 빈도가 낮다(골수세포 100,000개 당 stem cell 1개<sup>11</sup>)는 단점이 있다. 하지만 성체줄기세포는 윤리문제에 있어 자유롭고 백혈병 환자에게 쓰인 골수 내의 줄기세포 치료는 40년<sup>12</sup>, 제대혈 내의 간엽 줄기세포의 경우 20년간 임상 경험이 풍부하게 이루어져 있다는 장점이 있다. 특히 MSC의 경우 중배엽계의 세포로 전환이 용이하여 골과 연골 생성을 위한 조직공학에서 주목 받고 있다. MSC의 특성은 방추형 세포와 세포자체의 집착성, 재생성과 분화성이 있으며, haematopoietic antigen (CD45/34/14)에 대한 음성, stroma-associated marker (CD29/73/105/44), vimentin, laminin 그리고 fibronectin에 대한 양성반응을 나타낸다는 것이다.

이러한 MSC의 배양 용기에 잘 부착하는 특성을 이용한 간접 분리는 기존의 원심분리에 의한 줄기세포의 채취에 비해 용이하다고 알려져 있다<sup>13</sup>. 본 실험에서는 MSC의 이러한 특성을 이용하여 얻어진 세포들을 배양하여, 배양용기에 부착하지 못하는 여타의 세포들을 배지 교체 시에 반복하여 씻어 내었다. 배양용기에 부착되어 남겨진 세포들은 왕성한 증식을 보였으며, 이렇게 얻은 세포들이 간엽줄기 세포인지를 확인하기 위해 FACs를 시행하였다. 본 실험에서 쓰인 표지자는 CD44/105, CD34/45로 각 조직에서 분화시킨 세포에서 stroma-associated marker에 대한 양성반응과 CD45에 대한 음성 반응을 나타내어 MSC라 결론 내렸다.

MSC를 혈관 내에 주입하여 시행하는 세포치료에 대한 많은 동물실험 및 임상실험들이 실행되어왔다<sup>14-19</sup>. 1980년대에 Friedenstein의 연구 이후 MSC에 대한 연구는 세포치료와 더불어 골과 연골 같은 중배엽계 세포의 대체에 사용되기 시작했다<sup>20</sup>. 골 분화가 예상되는 MSC와 세포 및 scaffold를 이용한 골기질 대체물질에 대한연구가 long bone의 재건, 상악동 골이식술, 악골의 낭종 적출 후 시행되는 골이식술, 골신장술 등 다양한 임상증례에 적용되었다<sup>21-24</sup>. 최근에 치아에서 얻을 수 있는 DPSC, PDLSC, DFPC 등의 ectomesenchymal stem cell에 대한 연구가 재생 치의학의 관점에서 이루어지고 있다<sup>25</sup>. 일반적으로 골형성에는 골수유래 MSC가 기본적인 세포 공급원으로 사용된다. 골수내에는 풍부한 MSC들이 있으며 채취기원상 골로 분화될 가능성이 큰 조직이기 때문이다. 하지만 그동안 pulp와 PDL, dental follicle을 사용하여 stem cell을 분화하는 연구는 진행되어왔으나 이러한 stem cell이 골형성을 이루는 능력에 대한 평가는 적었던 실정이다. 본 실험은 주로 치아기원 stem cell의 multi potential 분화능력 중 골분화에 초점을 맞추어 실시하였다.

DPSC는 pulp에서 기원하기 때문에 상아질의 재생을, PDLSC와 DFPC는 치주인대와 백악질을 포함한 치주조직의 재생에 관여할 것이라는 예측을 할 수 있다. DPSC는 치아에서 분리할 수 있는 ectomesenchymal stem cell 중 가장 먼저 발견되었으며, 골수에서 분리되는 MSC와 세포적 특성이 비슷하나, odontoblast-like cell로 분화 가능하다<sup>7</sup>. 이후의 연구를 통해 배양조건을 변화시켜 근육조직, 신경조직, 연골과 골조직으로 분화가능하다는 것이 밝혀졌다<sup>26</sup>.

PDLSC의 경우 cementoblast-like cell과 adipocyte, collagen forming cell로 분화되었으며, 면역 억제된 쥐에 이식되었을 때 향후 치주조직의 재건에 기여할 수 있는 cementum과 PDL의 혼재양상을 보이는 조직을 형성하였고<sup>8</sup>, fibrin sponge와 bovine에서 추출된 비계에서 배양했을 때 4주 후에 골형성을 보이는 세포 mass를 생성했다<sup>27</sup>.

Dental follicle은 발생 중의 치아조직을 둘러싸고 있는 낭으로 치조골, PDL, cementoblast를 형성하는 전구체가 있을 것으로 예측되고 있으며, dexamethasone과 insulin을 배지에 첨가함으로써 시험관내에서 성숙한 PDL과 치조골로 분화가 가능했다<sup>28</sup>.

본 실험의 경우 ectomesenchymal stem cell의 골모세포로의 분화능력을 평가하기 위해 실험군은 dexamethasone, glycerolphosphate, ascorbic acid, glutamine을 첨가한 골분화 배지에서 각 세포를 분화시켜 분화 정도를 평가하였다. Alizarin red의 염색결과 3개의 실험군에서 공히 시간에 따른 무기질의 침착이 있었으며, 일반 배지에서 배양한 대조군에서도 시간에 따른 무기질 침착의 소견을 볼 수 있었다. Zhang에 의한 연구에 따르면 DPSC를 일반 배지에서 배양한 후 collagen 비계를 사용하여 면역 억제된 쥐에 주사하였을 때 odontogenic, adipogenic 한 분화를 이루는 것을 발견한 논문에서 볼 수 있듯이<sup>29</sup>, 대조군이 무기질 침착 소견을 보이는 이유는 stem cell을 얻은 각각의 조직이 정상 분화 시 상아질이나 백악질, 또는 치조골등 무기질을 형성하는 세포이기 때문에 나타나는 결과라고 추측하고 있다. 세가지 기원의 줄기세포는 각각 무기질을 형성하는 세포(odontoblast, cementoblast)들로 분화하지만 culture medium을 조절하였을 때 osteogenic potency를 가질 수 있다.

시험관 내에서 세포의 osteogenic capacity를 측정하기 위한 도구로 ALP activity가 일반적으로 사용된다. ALP는 조골세포의 전구체에서 발현되며, 세포가 배양되면서 조골세포로 분화될 것을 표시한다. 골형성 과정에서 초기에 제 1형 교원질이 먼저 생성되어 석회화가 이루어질 수 있게 해주며, 그 이후 기질이 성숙되는 단계에서 ALP, osteopontin과 osteonectin 등의 골형성 표지자가 나타난다<sup>30</sup>. Kotobuki 등은 osteoblast를 7일간 배양한 후 ALP activity에 따라 세포를 나눈 후 osteocalcin activity를 평가 한 실험에서 ALP activity가 골형성에 중요한 지표가 될 수 있음을 밝혀냈다<sup>31</sup>. Meijer 등이 시행한 악골의 결손부에 시행된 골수 줄기세포를 이용한 조직공학적 골이식 실험에서 ALP

activity는 줄기세포의 골모세포 분화 이후 7일부터 나타났으며<sup>32</sup>, 본 실험에서는 실험군에서 DPSC의 ALP가 PDLSC, DFPC의 ALP activity보다 현저히 낮은 수준으로 나타났고, 한번 발현된 ALP activity는 21일 동안 일정한 수준을 유지하였다. Dental pulp 기원의 줄기세포에서 골형성을 이룬 Laino의 연구와 비교해보면 골형성을 위한 세포공급원으로 dental pulp보다는 PDL이나 dental follicle이 더 유용할 것 같다<sup>33</sup>. cDNA microarray를 이용한 pulp 기원의 stem cell과 bone marrow 기원의 stem cell의 유전자 발현의 비교연구에 의하면 두 가지의 stem cell 모두 같은 MSC로 분류되는 세포군이지만 유전자 발현에는 차이가 있음이 나타났고<sup>34</sup>, 체외에서 증식된 DPSC, PDLSC, BMSC (bone marrow stem cell)을 비교한 일련의 논문에서 의하면, 각 줄기세포는 bone, cementum, dentin에 대한 antigen에 일반적인 발현 패턴을 나타내지만 각각의 줄기세포는 heterogenous한 것으로 평가되고 있다<sup>35-37</sup>. 마찬가지로 pulp와 PDL, dental follicle에서 얻은 각각의 stem cell로부터 분화된 osteoblast는 유전자 발현과 ALP의 활성도에서 일정 수준 차이를 보였다. 이는 각 실험조직에서 비롯된 줄기세포들이 FACs 결과 같은 중배엽계 줄기세포로 평가되고 동일한 배양조건에서 골모세포로 분화하여 세포의 기질을 석회화하는 분화 패턴을 보이더라도 조직이 채취된 부위에 따라 특성의 차이가 있다는 것을 보여주고 있다. 근본적으로 DPSC의 경우 dentin을 형성하는 odontoblast를 형성할 가능성이 크고, PDLSC나 DFPC의 경우 cementoblast나 PDL fiber 만들기 위한 fibroblast를 형성함과 동시에 치조골의 osteoblast를 재생할 가능성이 큰 줄기세포이기 때문에 ALP activity test상 실험군의 PDLSC와 DFPC가 DPSC보다 더 큰 활성도를 보인다고 생각했다.

7일 이후의 모든 실험군에서 ALP의 활성도와 OCN의 발현이 증가하는 것은 osteogenic pathway에서 골형성 가능성을 보여주는 것이며, 조직공학에서 골수기원의 stem cell 이외에 골형성에 사용될 수 있는 세포요소로서 제3대구치의 가능성을 보여주었다 할 수 있다.

아직까지는 stem cell과 같이 multipotent한 전구세포들을 임상적용 시 특정 세포로 정확히 분화시키는 데에는 한계가 있으며, 조직공학적 골재생 시 stem cell을 이용할지<sup>38</sup>, stem cell을 특정 세포로 분화시켜 이용할지<sup>32</sup>에 대한 추가적 연구가 필요하리라 생각한다.

치아기원의 줄기세포는 비교적 연령에 제한없이 얻을 수 있는 골수유래 줄기세포에 비해 획득할 수 있는 시간이 제한적이다. 환자의 연령이 높아짐에 따라 채취 가능한 치수와 치주인대의 양은 줄어들 것이며, 채취의 난이도 또한 높아질 것이다. 치낭의 경우 치아의 맹출기에만 존재하는 조직이므로 제3대구치의 맹출 후에는 얻을 수가 없다. 또한 줄기세포를 이용하는 치료를 필요로 하는 질병은 청소년기보다는 중장년기에 유발될 가능성이 높다. 이러한 시간적인 제약은 채취와 분화기술의 발달과 냉동보관 기술의

발달로 극복할 수 있으리라 사료된다. 2006년 Papaccio 등에 의한 실험에 의하면 DPSC와 DPSC로부터 유도된 골모세포는 2년간 냉동보관 후 해동하여도 그 세포적 특성이 변하지 않음을 알 수 있었다<sup>39</sup>. 특히 제3대구치의 경우 매복될 확률이 높아지면서 10대 후반과 20대 초반의 연령에서 발치가 이루어지고 있는 실정임을 고려 해볼 때, 냉동 제대혈의 임상적용의 경우에서 볼 수 있듯이 냉동보관의 기술이 향후 실용화의 중요한 기준이 될 것이다.

## V. 결 론

제3대구치는 일반적으로 10대 후반에서 20대 초반 사이에 완전히 성숙되지 않은 상태로 발치될 수 있는 유일한 치아이다. 성체줄기세포의 경우 채취할 수 있는 조직이 다양하지만 완전히 성숙되지 않은 조직에 많이 존재할 것이라는 가정하에 제3대구치를 이루고 있는 세포조직인 pulp, PDL, dental follicle에서 각각 줄기세포를 추출, 배양하고 이를 골재생을 위한 조직공학의 세포인자로의 가능성을 알아보기 위해 골분화 배지에서 키워 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. FACs 결과 pulp, PDL, dental follicle에는 중배엽 기원의 stem cell이 존재하고 있으며, 추출과 배양이 용이하였다.
2. 각 세포에서 추출한 stem cell은 bone differentiation medium에서 배양했을 때 시간이 지남에 따라 osteoblast로 추측되는 세포군집을 형성하였다.
3. Alizarin red 염색 시 실험군에서 모두 14일, 21일째 확연한 mineralization 경향을 보였다. 대조군에서도 14일, 21일 일정부분 mineralization 경향을 보였다.
4. ALP activity test를 시행한 결과 PDLSC와 DFPC에서 7일째 강한 활성도를 보였으며, 그 후 일정한 활성도를 보였다. DPSC의 ALP activity는 시간에 따라 증가하는 양상을 보였으나 PDLSC와 DFPC의 activity에 비해 유의하게 적었다.
5. RT-PCR 결과 실험군의 ALP는 7일째 OCN은 21일째 강한 양성반응을 보였다.

위의 결과에서 pulp, PDL, dental follicle에 중배엽기원의 줄기세포가 존재함을 확인할 수 있었고, 각 줄기세포는 골분화 배지에서 배양시킴으로써 골모세포로 분화시킬 수 있었다. PDL과 dental follicle 기원의 stem cell이 pulp 기원의 stem cell에 비해 osteogenic effect가 높았으며, 이는 채취된 조직의 특성이 추출된 stem cell의 분화능력에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이 연구를 통하여 발치된 치아에서 얻은 pulp와 PDL, dental follicle은 손상된 골의 재생을 위한 조직공학에서 골모세포 및 줄기세포 공급원으로서 사용이 가능함을 확인하였다.



## 참고문헌

1. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-22.
2. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
3. Bjorklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000;3:537-44.
4. Khang GS, Lee SJ, Lee IW, Lee HB. Stem cell: scientific progress and future research direction. *Polym Sci Technol* 2002;13:4-14.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
6. National Institutes of Health (NIH). Stem cells: scientific progress and future research direction [internet]. Bethesda, MD: NIH, 2001. Available from: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/fullrptstem.pdf>.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13625-30.
8. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-55.
9. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
10. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006;441: 1060.
11. Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2007;11:935-44.
12. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Haematopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone-marrow transplantation. (Control of the secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism). *Br Med J* 1963;28:1633-5.
13. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004;295:395-406.
14. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919-25.
15. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Müller-Newen G, Yu D, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2202-12.
16. Zhang H, Huang Z, Xu Y, Zhang S. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain following intracerebral hemorrhage. *Neurol Res* 2006;28:104-12.
17. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001;97:1227-31.
18. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13.
19. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8932-7.
20. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:263-72.
21. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bio ceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007;13:947-55.
22. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:724-9.
23. Pradel W, Eckelt U, Lauer G. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:285-90.
24. Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Katoh M, Ishiguro N. Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet-rich plasma. *J Pediatr Orthop* 2007;27:629-34.
25. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig* 2008;12:113-8.
26. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006;184:105-16.
27. Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piattelli A, et al. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report. *J Biomed Mater Res A* 2008;87:986-93.
28. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int* 2005;29:567-75.
29. Zhang W, Walboomers XF, van Kuppevelt TH, Daamen WF, van Damme PA, Bian Z, et al. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:117-25.
30. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-30.
31. Kotobuki N, Hirose M, Funaoka H, Ohgushi H. Enhancement of in vitro osteoblastic potential after selective sorting of osteoblasts with high alkaline phosphatase activity from human osteoblast-like cells. *Cell Transplant* 2004;13:377-83.
32. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials* 2008; 29:3053-61.
33. Laino G, Carinci F, Graziano A, d' Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg* 2006;17:511-5.
34. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001;29:532-9.
35. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81:531-5.
36. Batouli S, Miura M, Brahimi J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003;82:976-81.
37. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5807-12.
38. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004;75:1281-7.
39. Papaccio G, Graziano A, d' Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 2006;208:319-25.