

성견 치주인대세포의 줄기세포 특성 연구

김경화, 김수환, 설양조, 이용무*

서울대학교 치의학전문대학원 치주과학교실 및 치학연구소

I. 서론

줄기세포는 다양한 분화가가능성 때문에 세포치료제의 수단으로서 많은 연구가 진행되고 있다. 배아줄기세포는 세포의 특성상 세포분리방법이 까다롭고 윤리적인 문제 때문에 연구가 용이하지 않은 반면에, 성체줄기세포의 경우는 이 문제에서는 좀더 자유로울 수 있다. 이러한 이유로 배아줄기세포에 비하여 분화의 다양성에서 제한이 있긴 하지만, 성체줄기세포에 대한 연구 또한 활발하게 진행되고 있다. 성체줄기세포는 골수, 혈액, 뇌, 근육, 간, 치수 등의 조직에 존재한다고 알려져 있으며, 연구가 진행됨에 따라 성체줄기세포를 얻을 수 있는 조직의 종류가 점점 다양해지고 있다²⁾.

치주조직재생을 위해 골수나 전체 다른 기관에서 줄기세포를 분리하여 치료에 사용하는 것은 현실적으로 어렵기 때문에, 치과임상에서 접근이 용이한 구강 내 조직에서 줄기세포를 얻기 위한 연구들이 진행되고 있다. 치수, 치주인대, 치조골 등의 구강 내 조직에서 유래되는 줄기세포에 대한 연구들이 보

고되었으며, 이들 세포를 이용하여 *in vivo*에서 치주조직과 유사한 조직을 만들 수 있음이 밝혀졌다^{3,4,5)}. 성체줄기세포를 얻기 위한 문제점 중 하나는 줄기세포를 분리할 조직 채취 시 조직에 손상을 가져올 수 있다는 것이다. 이 문제를 해결하는 방법 중 하나는 폐기되는 조직에서 세포를 분리하는 것으로, 치주인대 같이 발치 후 치아에서 얻을 수 있는 조직은 성체줄기세포의 좋은 공급원이 될 수 있을 것이다.

치주인대는 석회화 되지 않은 결합조직으로 구성되어 있으며, 치조골과 치아를 연결하는 역할을 하여 치주질환에 의해 파괴 시 치아의 손실을 야기할 수 있다. 치주인대는 다양한 세포군의 집합으로 이루어진 것으로 알려져 있으며, 특히 그 분화의 다양성 때문에 오래 전부터 연구되어 왔다⁶⁾. 치주인대세포가 조골세포로 분화할 수 있다는 결과들이 이미 오래 전부터 보고되어 왔으며^{7,8)}, 최근의 연구에서는 치주인대에서 분리된 세포들이 지방세포로도 분화될 수 있으며 생체 내에서 백악질을 형성시킬 수 있다고 밝히고 있다³⁾. 또한 이 연구에서 치주인대세포가 줄기세포의 특징인 자가증식력을 가지고 있으며, 중배엽줄기

* 교신저자 : 이용무, 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 치의학전문대학원 치주과학교실 110-749 (전자우편 : ymlee@snu.ac.kr)

* 이 논문은 2006년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(M10646010003-06N4601-00310).

세포의 표지인자인 STRO-1과 CD146/MUC18을 발현 한다는 것을 확인하였다.

성견을 이용한 동물연구에서 치조골결손부에서 치조골재생을 목적으로 골수에서 얻은 줄기세포를 자가이식한 결과가 보고된 바⁹⁾ 있다. 하지만 실제 치과임상의 특성상 골수채취가 용이하지 않음을 고려하면, 다른 구강 내 줄기세포 공급원을 찾을 필요가 절실하다 하겠다. 성견에서 구강 내 조직을 이용한 줄기세포 이식연구를 위하여, 이 연구에서는 일차적으로 성견에서 치주인대세포를 분리하는 방법을 고안하고, 치주인대에서 분리된 세포의 줄기세포로서의 특성을 평가하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 치주인대세포의 분리

생후 1년 된 2마리의 13~15kg beagle dog을 덤푼(5mg/kg)(한국바이엘, 한국)과 케타민(10mg/kg)(유한양행, 한국)을 주사하여 전신마취를 유도한 후에 피네프린을 함유한 염산리도카인으로 발거 대상 치아 부위의 국소마취를 시행하였다. 치아 발거 전에 채취 큐렛을 사용하여 해당 치아의 치석 및 치태를 제거하고, 생리식염수로 여러 번 세척하였다. 하악 좌, 우측 제 2, 3, 4 소구치를 발거하여 Hank's Balanced salt solution(HBSS)(Invitrogen, USA)에 넣어서 이동하였다. 발거한 치아의 치근의 중간 부위에 위치한 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음 60mm 세포배양접시에 고르게 분산시켰다. 1% antibiotic-antimycotic 용액(Invitrogen, USA) 및 10% FBS(Invitrogen, USA)가 첨가된 DMEM(Invitrogen, USA)을 이용하여 세포배양을 시행하였다. 3일 간격으로 배양액을 교환해주면서 4 계대까지 배양하였으며 각각의 실험에는 2~4 계대의 세포를 사용하였다. 배양시 습도는 100%, 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다.

2. 집락형성능(colony forming efficiency) 관찰

자가증식(self renewal)능을 확인하기 위하여 집락형성능을 관찰하였다. 배양된 세포를 Trypsine-EDTA(Invitrogen, USA)로 처리한 후 70um Strainer(Falcon, USA)을 통과시켜 단일세포현탁액을 만들었다. 1×10⁴ 개의 단일세포를 10cm 직경의 세포배양접시에서 10일 동안 배양한 후 10% 중성 포르말린에서 고정을 시행하고, 0.1% toluidine blue 용액으로 염색하였다. 50개 이상의 세포로 구성된 세포 집락군을 단일 colony로 평가하였으며, 그 colony의 숫자를 세고 세포의 형태를 광학현미경(Olympus, Japan)에서 40배의 배율로 관찰하였다.

3. 세포증식률 관찰

세포의 증식률을 관찰하기 위하여 BrdU staining kit(Roche, Germany)를 이용하여 염색을 시행하였다. 5×10³세포를 8 well chamber slide(Nunc, EU)에서 23시간 동안 배양한 후 BrdU를 넣고 1시간 동안 추가로 배양하였다. 에탄올-글라이신 용액으로 세포를 고정한 후 anti-BrdU를 넣고 37°C에 30분 동안 방치하였다. 30분 후 washing buffer로 세포를 3회 헹군 후, anti-mouse IgG를 넣고 다시 37°C에 30분 동안 방치하였다. 30분 후 다시 washing buffer로 세포를 3회 헹군 후, mounting을 실시하고 공초점형광현미경(Olympus, Japan)에서 200배의 배율로 관찰하였다.

4. STRO-1과 CD 146의 발현 관찰

중간배엽줄기세포의 표지인자인 STRO-1과 CD146의 발현을 관찰하기 위하여 2×10⁴의 세포를 8 well chamber slide에 접종한 후 1일 동안 배양하였다. 2차 항체의 비특이적인 반응의 유무를 확인하기 위하여 음성대조군으로 primary antibody 없이 2nd antibody만 첨가하여 관찰하였다. STRO-1의 발현

을 관찰하기 위해서 배양된 세포를 10% 중성 포르말린에서 15분 동안 고정한 후 1% BSA용액으로 1시간 동안 블로킹 하였다. mouse anti STRO-1 antibody (R & D systems, USA)를 넣고 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 1x PBS(pH7.4)(Invitrogen, USA)로 5분씩 3회 행구어 준 후 goat anti mouse IgM-Alexa 488(Invitrogen, USA)를 넣고 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 1x PBS로 5분씩 3회 행구어 준 후 마운팅을 실시하고 공초점형광현미경에서 400배의 배율로 관찰하였다.

CD146의 발현을 관찰하기 위해서 배양된 세포들을 10% 중성 포르말린에서 15분 동안 고정하였다. 1% BSA용액으로 1시간 동안 블로킹 한 후 mouse anti CD146 antibody(abcam, UK)를 넣고 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 1x PBS로 5분씩 3회 행구어 준 후 rabbit anti mouse IgG Texas Red (abcam, UK)에서 1시간 동안 방치하였다. 1x PBS로 5분씩 3회 행구어 준 후 300nM DAPI (Invitrogen, USA)로 염색을 시행하고 공초점형광현미경에서 200배의 배율로 관찰하였다.

5. 세포분화능 관찰

1) 골세포로의 분화능 관찰

조골세포로의 분화가능성을 관찰하기 위하여 염기성 인산화효소 발현 및 석회화결절 형성능을 관찰하였다. 염기성 인산화효소 발현 및 석회화결절 형성능을 관찰하기 위하여 1×10^4 세포를 8well chamber slide와 24well plate에서 각각 14일 동안 배양하였다. 세포를 배양한 배지는 1% antibiotic-antimycotic 용액, 15% FBS, 10mM sodium β -glycerolphosphate (Sigma, USA), 50 μ g/ml ascorbic acid(Sigma, USA), 50nM dexamethasone(Sigma, USA)이 첨가된 DMEM을 사용하였고, 배양 시 습도는 100%, 온도는 37 $^{\circ}$ C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 염기성 인산화효소의 활성을 관찰하기 위하여 naphthol AS-BI phosphate (Sigma, USA)와 fast red violet(Sigma, USA)으로 염색한

후 광학현미경하에서 관찰하였다. 석회화 결절 형성능을 관찰하기 위하여 세포를 0.1% Alizarin Red S 용액(pH4.2)으로 염색한 후 석회화결절 양상을 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 배양한 후 세포가 밀생배양될 때까지 7일 동안 추가로 배양하였다. 이후 adipogenic induction 배지에서 3일, adipogenic maintenance 배지에서 1일 동안 배양을 하였으며, 이것을 3회 반복하였다. 이 후 adipogenic maintenance 배지에서 추가로 7일 동안 배양하였다. 배양시 습도는 100%, 온도는 37 $^{\circ}$ C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 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 1.2×10^5 개의 세포를 5ml의 StemXVivo chondrogenic basal media(R & D systems, USA)에서 잘 풀어준 후 200xg에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다. 세포를 다시 0.5ml StemXVivo chondrogenic differentiation media(R & D systems, USA)에 잘 풀어준 후 200xg에서 5분 동안 실온에서 원심분리하여 펠렛을 형성시켰다. 배지를 제거하지 않은 채로 15ml conical tube(SPL, Korea)에서 28일 동안 배양을 하였으며 2~3일에 한 번씩 0.5ml StemXVivo chondrogenic differentiation media로 갈아주었으며, conical tube의 뚜껑을 살짝 덮어 가스의 공급이 원활하도록 하였다. 배양시 습도는 100%, 온도는 37 $^{\circ}$ C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 배양이 끝난 후 세포를 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 세포를 마이크로톰으로 4 μ m의 두께로 자른 후 염색을 시행하였다. 파라핀을 제거한 후 Weigert's iron hematoxylin(Sigma, USA)에서 염색을 하였고, 산성 알코올에서 탈염을 하였다. 0.02% 수용성 fast green FCF(Sigma, USA)로 다시 염색한 후 산성 알코올에서 탈염을 하고, 0.1% 수용성 safranin-O(Sigma, USA)로 염색을 시행하였다. 다시 알코올로 탈수를 시행한 후 마운팅을 실시하고 광학현미경하에서 관찰하였다.

III. 결과

1. 집락형성능(colony forming efficiency) 및 세포증식률 관찰

줄기세포에서 특징적으로 보이는 자기증식(self renewal)능을 확인하기 위하여 집락형성능을 관찰하였다. 10일 동안 배양된 단일세포의 집락형성능은 다양하게 나타났고, 그 중 50개 이상의 세포로 구성된 세포 집락군의 숫자는 평균 194개였으며, colony의 직경은 1~2mm였다. 다른 중배엽줄기세포와 마찬가지로 배양접시 바닥에 부착되어 집락을 형성하면서 자랐으며(Figure 1A), 섬유아세포의 형태를 보였다(Figure 1B). 세포의 증식률을 관찰하기 위하여

BrdU로 염색을 한 결과 전체 세포 중 25% 정도가 BrdU로 염색되었다(Figure 1C)

2. STRO-1과 CD146의 발현 관찰

초기 중배엽줄기세포의 표지인자 중 표면항원인 CD146과 STRO-1의 발현을 면역형광염색법으로 관찰한 결과 두 인자 모두 성견의 치주인대세포에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2).

3. 세포분화능 관찰

성견의 치주인대에서 유래된 세포의 조골세포로의 분화능을 관찰하기 위하여 염기성 인산화효소의 생성 및 석회화결절 형성능을 관찰하였다. 14일 동안 ascorbic acid와 β -glycerolphosphate가 함유된 골세포분화유도용 배지에서 배양된 세포 중에서 염기성 인산화효소의 양성반응을 보이는 세포가 관찰되었으나, ascorbic acid와 β -glycerolphosphate가 함유되지 않은 일반배지에서 배양된 세포들에서는 염기성 인산화효소의 양성반응을 보이는 세포를 관찰할 수 없었다(Figure 3A, B). alizarin red S로 염색한 경우에도 골세포분화유도용 배지에서 자란 세포에서는 alizarin red S로 염색된 석회화결절이 관찰되었으나 일반배지에서 자란 세포에서는 관찰되지 않았다(Figure 3C, D).

지방세포로의 분화능을 관찰하기 위하여 dex-

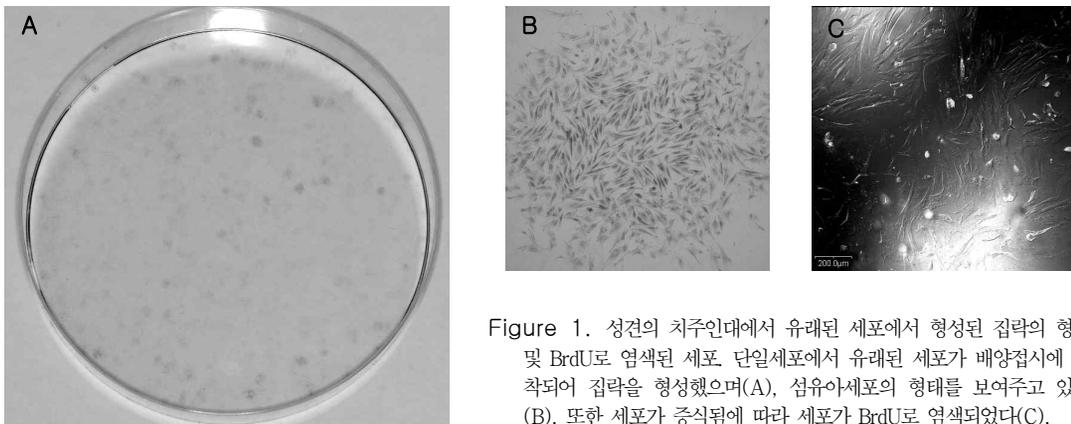


Figure 1. 성견의 치주인대에서 유래된 세포에서 형성된 집락의 형태 및 BrdU로 염색된 세포. 단일세포에서 유래된 세포가 배양접시에 부착되어 집락을 형성했으며(A), 섬유아세포의 형태를 보여주고 있다(B). 또한 세포가 증식됨에 따라 세포가 BrdU로 염색되었다(C).

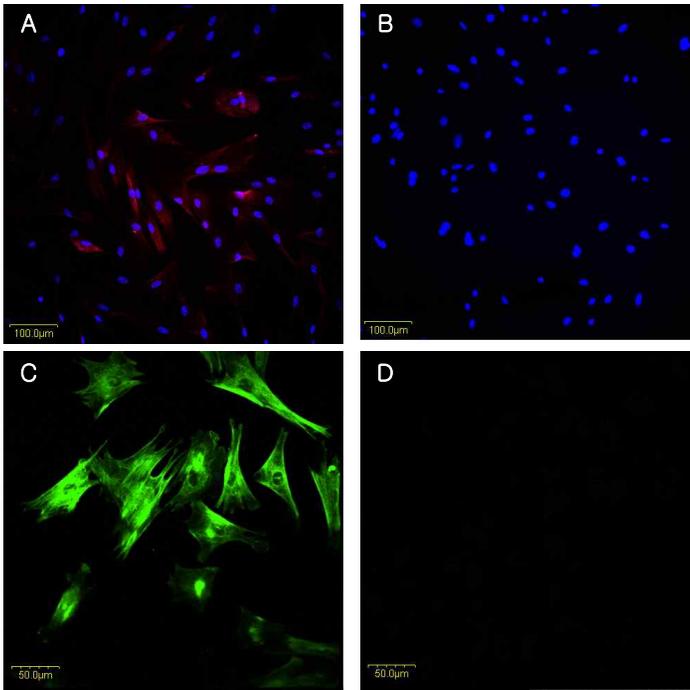


Figure 2. 성견의 치주인대세포에서 발현되고 있는 CD146과 STRO-1. 중간엽줄기세포의 표지인자인 CD146/MUC18(A,B)와 STRO-1(C,D)의 발현을 면역형광염색법으로 염색을 하였다. 성견의 치주인대세포에서 CD146과 STRO-1의 발현을 관찰할 수 있었으며, 2차 항체만 반응시킨 음성대조군에서는 발현을 관찰할 수 없었다. 공초점형광현미경하에서 각각 200배, 400배로 관찰하였으며, CD146/ MUC18의 발현 관찰시 핵을 DAPI로 비교염색하여 관찰하였다.

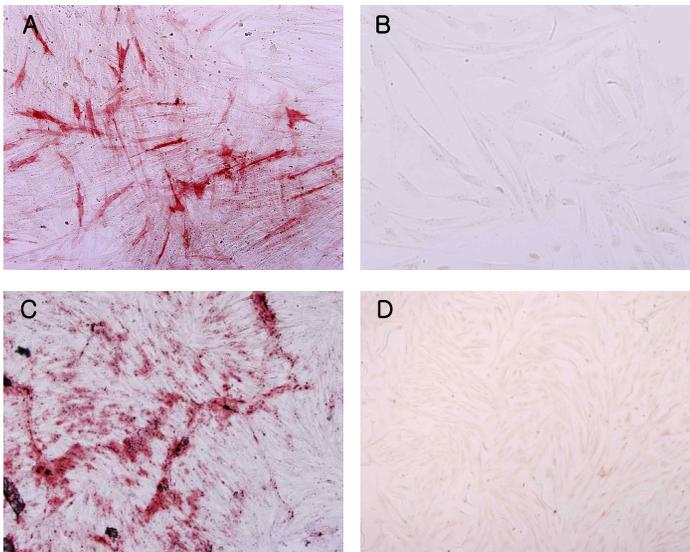


Figure 3. 성견의 치주인대에서 유래된 세포의 골세포로의 분화능. 치주인대에서 유래된 세포를 골세포분화유도용 배지에서 배양한 군에서는 염기성 인산화효소 양성반응을 보였으며(A) 석회화결절이 alizarin red s로 염색되어 관찰되었으나(C) 일반배지에서 배양한 군에서는 염기성 인산화효소 양성반응을 보이는 세포는 관찰되지 않았으며(B), 석회화결절들 역시 관찰되지 않았다(D).

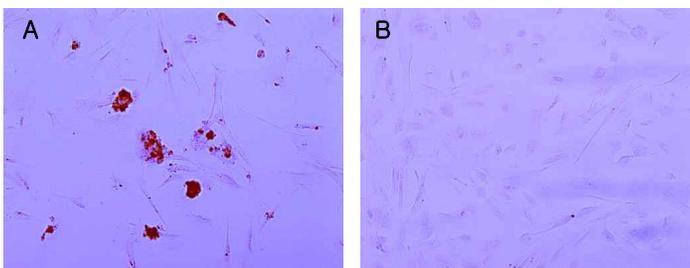


Figure 4. 성견의 치주인대에서 유래된 세포의 지방세포로의 분화능. 치주인대에서 유래된 세포를 지방세포분화유도용 배지에서 배양한 군에서는 세포 내에 축적된 lipid vacuole이 oil red o로 염색되어 관찰되었으나(A), 일반배지에서 배양한 군에서는 lipid vacuole이 관찰되지 않았다(B).

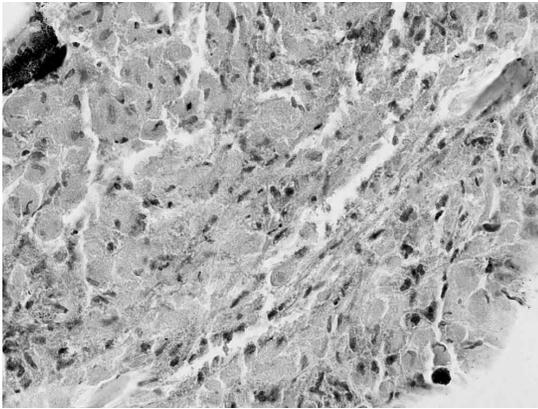


Figure 5. 성견의 치주인대에서 유래된 세포의 연골세포로의 분화능. 세포를 원심분리로 모은 후 연골분화용 배지에서 28일 동안 배양했으나 연골세포로의 분화는 관찰되지 않았다.

methasone, isobutyl-1-methyl xanthine, indomethacin, insulin 등이 함유된 배지에서 배양된 세포를 oil red O로 염색한 결과, oil red O로 염색된 lipid가 축적된 세포가 관찰되었으나(Figure 4A), 일반배지에서 배양된 세포에서는 oil red O로 염색된 lipid가 축적된 세포들이 관찰되지 않았다(Figure 4B).

연골화 분화능을 관찰하기 위하여 28일 동안 세포를 연골세포분화용 배지에서 배양한 후 fast green FCF와 수용성 safranin-O로 염색을 시행하였다. 그러나 연골로 분화된 세포를 관찰할 수 없었다(Figure 5).

IV. 고안

치주인대는 치아와 치조골 사이에 위치한 조직으로 다양한 분화단계의 여러 종류의 세포군으로 구성되어 있다^{10,11}). 1980년대에 치주인대세포가 골, 백악질, 치주인대의 기질 등을 합성할 수 있으며, 치주인대 내 혈관 주위에 분포하는 세포들 중에 줄기세포가 존재할 수 있다는 가능성이 제기되었다¹²). 최근의 연구에서도 사람의 치주인대세포에서 유래한 세포가 골세포나 지방세포로 분화될 수 있으며, ex vivo에서 사람의 치주인대세포가 백악질, 치주인대 및 치주조직을 재생할 수 있다고 밝히고 있다^{3,13}). 이러한 결과들은 치주인대유래 줄기세포가 치주조직 재생에 있어 중요한 역할을 하며, 치주조직재생용

세포치료제로서 주요 세포공급원이 될 수 있음을 보여주는 연구결과라 할 수 있다.

사람에서 치주조직재생의 목적으로 치주인대유래 줄기세포를 이용하기 위해서는 동물을 이용한 연구가 선행되어야 할 필요가 있다. 이를 위한 실험동물로는 마우스, 백서 또는 가토 등이 사용될 수 있으나, 그 개체의 크기나 구강구조의 특성 때문에 구강 내에서 실험하기가 용이하지 않고, 따라서 구강 내에서 일어나는 조직반응을 관찰하기에는 한계가 있다. 성견의 경우, 구강구조의 특성상 치주조직재생에 관한 동물실험 모델에서 가장 많이 사용되는 동물이다. 이전의 연구에서 성견의 골수에서 얻은 줄기세포를 자가이식하여 치조골재생을 도모한 결과¹⁴)가 보고된 바 있었지만, 골수에서 줄기세포를 얻어 사용하는 것은 치과임상의 특성상 응용가능성이 아주 낮다고 할 수 있다. 따라서 치과임상의 응용가능성을 위해서는 줄기세포공급원을 구강 내 조직에서 찾을 필요가 절실하다고 할 수 있다. 줄기세포공급원으로서 구강 내 조직인 치주인대를 이용하고, 치주인대에서 유래한 치계줄기세포를 이용한 치주조직 재생연구를 성견 모델에서 수행하고자 본 연구에서는 우선 성견의 치주인대세포의 분화능 및 줄기세포의 존재 가능성을 관찰하였다.

본 연구에서는 치아에 부착되어 있는 치주인대조직을 효소를 이용하지 않고 물리적으로 잘게 잘라서 세포배양접시에서 배양하여 그 조직에서 자라난 세포를 이용하였다. 이렇게 분리된 세포에서 줄기세

포의 가장 대표적인 특징인 자가증식능을 확인하기 위하여 집락형성능을 관찰한 결과, 성견의 치주인대 세포 역시 사람의 줄기세포에서와 마찬가지로 집락을 형성하였으며, 배양접시에 부착되어 섬유아세포의 형태를 유지하면서 증식되었다. 그 집락의 숫자는 서³⁾ 등의 논문에서 collagenase와 dispase를 이용하여 분리해 낸 사람의 치주인대세포의 집락수와 비슷했다. 그러나 본 연구와 비슷한 방법으로 사람의 치주인대세포를 분리해 낸 연구에서 보고된 결과와는 약간의 차이를 보이고 있으며¹³⁾, 이는 종의 차이 혹은 세포 배양방법의 차이 등에서 생겨난 결과일 수 있다. BrdU 양성반응을 보인 세포들은 전체 세포 중 25% 정도였으며, 이는 사람의 치주인대세포보다 낮은 양상을 보였다. 초기 중배엽줄기세포의 표지인자로 추정되고 있는 STRO-1과 CD146/MUC18은 혈관 주변부에 위치하는 세포에서 발현되는 표면항원물질로서, STRO-1을 발현하는 골수유래 세포는 골세포, 지방세포, 연골세포 등으로 분화할 수 있는 다분화성(multipotential)을 가지고 있다¹⁵⁾. 또한, 골수유래세포 중 STRO-1을 발현하는 세포들은 CD146을 발현할 수 있으며, 세포집락군을 형성할 수 있다고 알려져 있다¹⁶⁾. CD146은 혈관내피 세포에서 발현되는 표면항원물질로 건강한 상태의 혈관에서 보다는 염증, 면역반응, 종양성 질환, 심혈관질환 등이 발생했을 때 나타나는 세포들에서 발현되며, 혈관의 신생이나 혈관재생의 표지인자로 사용되어지기도 한다¹⁷⁾. 지방조직에서 분리된 세포의 연구에서 STRO-1이나 CD146을 발현하는 세포를 각각 분리해서 그 분화능을 관찰한 결과 각각 모두 골세포, 지방세포, 연골세포 등으로 분화된다고 보고되었다¹⁸⁾. 서³⁾ 등 논문에서도 사람의 치주인대유래세포에서 STRO-1과 CD146/MUC18의 발현을 관찰함으로써 치주인대세포 내의 중배엽줄기세포의 존재가능성을 보고하고 있으며, Chen¹⁹⁾ 등의 연구에서는 사람의 치주인대조직을 분리하여 치주인대조직 내 혈관 주변부에서 STRO-1과 CD146/MUC18의 발현되는 세포의 위치를 관찰함으로써 치주인대조직 내 줄기세포의 존재가능성을 밝히고 있다. 본 연구에서도

성견의 치주인대세포에서 STRO-1과 CD146/MUC18이 발현됨을 확인할 수 있었다. 이는 성견의 치주인대세포 내에 중배엽줄기세포의 존재가능성을 보여 주며, 이들 세포들이 다분화성을 가지고 있음을 예측할 수 있게 해주는 결과라 할 수 있다.

중배엽줄기세포의 다분화성은 줄기세포의 가장 큰 존재 이유이면서 관찰하는 세포의 줄기세포 여부를 판가름할 수 있는 주요 특징이다. 성견에서 유래된 치주인대세포 역시 사람의 세포에서와 마찬가지로 조골세포나 지방세포로 분화가 되었으나, 연골세포로는 분화되지 못했다. 치주인대세포에서 연골세포로의 분화에 관한 연구에서, *in vivo*에서 탈회된 골을 치주인대에 이식했을 경우에 근육이나 피하조직에 이식 시 생성된 연골의 양과 비교해서 거의 연골의 형성을 관찰할 수 없었다고 보고하고 있으며²⁰⁾, 그 밖의 다른 연구에서도 치주인대세포의 연골세포로의 분화에 대해서는 보고된 바가 없다. 이는 골수유래 줄기세포보다 치주인대유래 줄기세포가 좀더 분화된 세포라는 연구결과와 관련이 있을 수 있다²¹⁾.

이 연구에서는 성견의 치주인대에서 유래한 세포에서 집락형성능, 초기줄기세포표지자의 발현, 다분화성을 관찰함으로써 줄기세포의 존재가능성을 확인하였다. 이 연구의 결과는 성견에서 구강 내 조직원인 치주인대에서 줄기세포를 얻을 수 있음을 보여주는 것으로, 치계줄기세포를 이용한 줄기세포이식 동물연구 모델 개발에 중요한 진척을 이루는 것이라 할 수 있다.

V. 결론 및 요약

이 연구에서는 치계줄기세포를 이용한 골조직재생 동물 모델로서 성견을 이용하고자 성견에서 치주인대세포를 분리하여 줄기세포의 존재여부를 관찰하였다. 연구결과, 성견에서 분리된 치주인대세포는 세포집락형성능을 가지고 있었으며, CD146/MUC18, STRO-1 등이 발현되었고, 골세포나 지방세포로 분화될 수 있음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 성견의 치주인대에 중배엽줄기세포가 존재함을 확인하

는 것으로 향후, 성견의 골조직재생 동물실험 모델에서 치주인대에서 분리된 치계줄기세포가 유용하게 이용될 수 있음을 보여주는 것이다.

VI. 참고문헌

1. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 414:98-104.
2. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001;414:118-121.
3. Seo BM, Miura M, Gronthos S et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;10-16;364:149-155.
4. 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 U S A*. 2000;97: 13625-13630.
5. Matsubara 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.
6. McCulloch CA, Barghava U, Melcher AH. Cell death and the regulation of populations of cells in the periodontal ligament. *Cell Tissue Res*. 1989;255:129-138.
7. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol*. 1991;62:499-503.
8. 김현중, 최상목, 이용무 등. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 분화에 미치는 rhBMP - 2의 효과에 대한 연구, 대한치주과학회지 2002;32: 389-402
9. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, et al. Enhancement of periodontal tissue re-generation by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*. 2004;75:1281-1287.
10. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontol Res*. 1991;26: 144-154.
11. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontol Res*. 1997;32:159-165.
12. McCulloch CA. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec*. 1985;211:258-262.
13. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res*. 2006;41: 303-310.
14. 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.
15. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170:73-82.
16. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25:1384-1392.
17. Wu H, Riha GM, Yang H, Li M, Yao Q, Chen C. Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells. *J Surg Res*. 2005;126:193-198.
18. Zannettino AC, Paton S, Arthur A et al. Multipotential human adipose-derived

- stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2007 [Epub ahead of print]
19. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodont Res* 2006;41:547–553.
 20. 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.
 21. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone.* 1997;21:225–235.

Stem cell properties of cells derived from canine periodontal ligament

Kyoung-Hwa Kim, Su-Hwan Kim, Yang-Jo Seol, Yong-Moo Lee

Department of Periodontology School of Dentistry Seoul National University

In spite of the attention given to the study of mesenchymal stem cells derived periodontal ligament (PDL), there is a lack of information about canine PDL cells. In this study, we characterized canine PDL cells to clarify their stem cell properties, including self renewal, proliferate rate, stem cell markers and multipotency.

PDL cells were obtained from extracted premolars of canines, following a colony forming assay and proliferation rate of sub-confluent cultures of cells for self-renewal, immunostaining for STRO-1 and CD146/MUC18 and a differentiation assay for multipotency.

Canine PDL cells formed single-cells colonies and 25% of the PDL cells displayed positive staining for BrdU. The cells expressed the mesenchymal stem-cell markers, STRO-1 and CD146/MUC18. Under defined culture conditions, the cells differentiated into osteoblasts and adipocytes, but the cells didn't differentiated into chondrocytes.

The findings of this study indicated that the canine PDL cells possess crucial stem cells properties, such as self-renewal and multipotency, and express the mesenchymal stem cell markers on their surface. The isolation and characterization of canine PDL cells makes it feasible to pursue preclinical models of periodontal regeneration in canine.