

백서두개골 결손부에서 *Escherichia coli* 발현 시스템으로 생산된 rhBMP-2의 골형성 효과

권석훈¹, 임현창¹, 최경희², 김민수¹, 이지현¹, 정의원¹, 윤정호³, 김창성¹, 최성호¹, 조규성^{1*}

1. 연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소

2. (주) 코웰메디, 기술연구소

3. 관동대학교 의과대학 명지병원 치과

Effect of rhBMP-2 produced by *Escherichia coli* expression system on bone formation in rat calvarial defects

Suk-Hoon Kwon¹, Hyun-Chang Lim¹, Kyung-Hee Choi², Min-Soo Kim¹, Ji-Hyun Lee¹,
Ui-Won Jung¹, Jeong-Ho Yun³, Chang-Sung Kim¹, Seong-Ho Choi¹, Kyoo-Sung Cho^{1*}

1. Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration College of Dentistry, Yonsei University

2. Research Development Institute, Cowellmedi Co. LTD

3. Department of Dentistry, College of Medicine, Kwandong University, Myongji Hospital

ABSTRACT

Purpose: Recombinant human bone morphogenetic protein-2(rhBMP-2) has been evaluated as potential candidates for periodontal and bone regenerative therapy. In spite of good prospects in BMP applications, there is economically unavailable for clinical use in dental area. The purpose of this study was to evaluate the osteogenic effect of rhBMP-2 produced by *E.coli* expression system.

Materials and methods: Eight-mm critical-size calvarial defects were created in 48 male Sprague-Dawley rats. The animals were divided into 6 groups of 8 animals each. Each group received one of the following: Negative control(sham-surgery control), positive control(absorbable collagen sponge(ACS) alone) and experimental(ACS loaded with rhBMP-2). Defects were evaluated by histologic and histometric parameters following 2- and 8-week healing intervals.

Results: The experimental group showed significant defect closure at 2 and 8weeks than the sham surgery and positive control groups. Moreover, the experimental group showed significantly greater new bone and augmented area than the other groups at both 2 and 8weeks.

Conclusion: rhBMP-2 produced by *E.coli* expression system may be effective for bone regeneration.

(J Korean Acad Periodontol 2009;39:77-86)

KEY WORDS: bone morphogenetic protein-2; *E.coli* expression system; Absorbable collagen sponge; rat calvarial defect.

서론

현재까지 상실된 치조골 재생을 위하여 자가골 이식, 골

대체제의 적용, 골유도 재생술 등 여러 방법들이 개발되어 왔으며, 이 술식들은 비교적 예지성 있는 술식으로 증명되었다. 그러나 이러한 술식들은 술자의 술기에 좌우되는 경향이 크며, 골결손부의 외형이 재생에 불리한 경우, 결손부가 광범위한 경우 그 임상적 적용에 한계가 있다. 이러한 점들을 극복하기 위한 일환으로, 최근 조직 공학의 발전에 따라 성장인자에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 골재생 분야에 있어서도 골형성단백질(Bone Morphogenetic

Correspondence : Kyoo-Sung Cho
Department of Periodontology, School of Dentistry, Yonsei University,
134 Shin-chon Dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-752, Korea.

E-mail: kscho@yuhs.ac, Tel: 02-2228-3188, Fax: 02-392-0398

* 이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-314-E00184).

Received: Feb. 12, 2009; Accepted: Mar. 11, 2009

Protein; BMP)의 개발과 임상적 활용에 대한 연구가 광범위하게 이루어지고 있다.

1965년 Urist는 설치류를 이용한 동물 실험에서 피하층과 근육층에 매식된 골조직 추출물에서 연골과 골, 골수를 유도하는 단백질들을 발견하고 이를 골형성단백질로 명명하였으며¹⁾, 이어서 골형성단백질의 효과에 영향을 미치는 기질 내 요소들을 확인한 바 있다²⁾. 이로부터 많은 연구와 실험이 있었으며 Wozney 등은 단백질 정제와 복제를 통한 방법으로 재조합 인간 골형성단백질(recombinant human BMP)을 제조하기에 이르렀다³⁾.

골형성단백질에는 여러 가지 아형이 존재하는데 이 중 제2형 골형성단백질(BMP-2)은 골유도를 할 수 있는 물질로 특징 지어져 왔다. 아미노산 염기 서열로 볼 때 제2형 골형성단백질은 종양증식인자- β (transforming growth factor- β ; TGF- β)의 상과(superfamily) 중 하나로 분류되기도 한다^{3,4)}. 제2형 골형성단백질은 반응 세포 표면에 존재하는 수용체에 붙어서 국소적으로 작용하게 되는데, 혈소판 유래 성장인자(Platelet-derived growth factor; PDGF), 인슐린 유사 성장인자(Insulin-like growth factor; IGF)와 같은 성장인자와는 다른 기전을 갖는다. 위의 성장인자들은 이미 만들어진 골세포나 골세포의 조상세포에 작용하여 분열을 촉진하는 기전을 가지고 있는 반면, 제2형 골형성단백질은 간엽 줄기 세포와 같은 전구 세포가 신생골을 형성할 수 있는 성숙한 골아세포로 분화하는데 영향을 미치는 요소들을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 실제로 골형성단백질들은 미분화 간엽세포에서 골아세포로의 분화 과정 동안 osteocalcin과 같은 골아세포 표현형의 표지자 발현을 유도할 수 있다⁵⁾. 이 외에도 in vitro 상에서 다양한 세포에서의 제2형 골형성단백질의 생물학적 활성에 대해 많은 연구들이 발표되어 왔다⁵⁻¹²⁾.

In vivo상에서 제2형 골형성단백질이 적용된 후, 골유도 효과는 골형성에 있어 필요한 일련의 세포 활동을 개시함으로써 시작되며^{1,3,13)}, 이러한 세포 활동이 일어나는 동안 국소적으로 일정 농도를 유지하면서 충분한 시간 동안 유지되어야 한다. 이러한 이유로 제2형 골형성단백질을 액상으로 주입하는 것은 골형성단백질이 작용하기 위한 일정 농도 이하로 희석되기 쉽고, 재생을 원하는 부위에 선택적 적용이 일어날 수 없기 때문에 의미가 없으며 특정한 전달체를 필요로 하게 된다. 이러한 전달체의 조건을 충족하기 위해서는 국소적인 조직반응을 최소화 할 수 있어야 하고, 생체적

합성 및 생분해성이 있어야 하며 궁극적으로 전달체가 신생골로 치환되어야 하는 등의 특성이 갖추어져야 한다¹⁴⁾. 현재까지 흡수성의 콜라겐 스폰지(absorbable collagen sponge; ACS)와 β -tricalcium phosphate(β -TCP)가 제2형 골형성단백질의 운반체로 널리 연구되어 왔다¹⁵⁻²⁰⁾. 콜라겐 스폰지는 지혈 용도나 흡수성 차단막으로써 치과임상에 일반적으로 사용되는 재료로 생체적합성이 증명되었고 이를 제2형 골형성단백질의 전달체로 사용하였을 때 우수한 골재생 결과가 보고되었다^{21,22)}. 그러나 콜라겐 전달체는 비교적 흡수가 빠르게 일어나므로 골형성단백질이 장기적으로 유리되는데 제한적일 수 있으며, 물리적 성질이 우수하지 못하므로 결손부의 형태가 불량할 경우 공간 유지에 적합하지 않을 수 있다. β -TCP는 다공성 구조를 가지고 있으며 공간 유지 능력이 콜라겐에 비해 우수하므로 골결손부에서 골형성단백질을 서서히 유리시킬 수 있는 가능성이 있으며, 이와 관련하여 β -TCP의 전달체로서의 효용성에 대한 연구가 이루어져 왔다^{15,16)}. 또한 Fibrin-Fibronectin sealing system(FFSS)나 Fibrin glue와 같은 조직으로부터 유래된 중합체들이 제4형 재조합 골형성단백질의 운반체로서 사용될 수 있는가에 대한 연구가 있기도 하였다^{23,24)}.

제2형 골형성단백질은 지금까지 밝혀진 성장 인자 중에서 골형성 유도물질로 가장 적합한 것으로 평가 받고 있고 또한 골재생과 재건을 위해 임상적으로 사용될 수 있다고 기대되고 있다. 2007년에는 미국 FDA에서 치과 영역에서 사용할 수 있는 제2형 재조합 골형성단백질(Infuse[®]; Medtronic Sofamor Danek)의 사용을 승인하였고, 국내적으로도 골형성단백질의 개발과 활용에 대한 노력이 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 골형성단백질의 적용으로 인해 우수한 골재생 효과가 있다 하더라도 많은 양을 생산해 내는데 어려움이 있어 연구와 임상 사이에 괴리가 있는 것이 사실이며, 생산에 많은 비용이 소요되기 때문에 아직까지 치과 영역에서 모든 환자에게 일반적으로 사용하기에는 비경제적이라는 어려움이 있다.

기존의 골형성단백질 생산은 Chinese Hamster Ovary cell(CHO cell) 등의 포유류 세포를 이용하여 제조되었는데^{3,25)} 생산 비용이 높아 대량 제조에는 적합하지 않으며, 일정 효과를 얻기 위한 용량을 사용하기에 많은 비용 부담이 필요하여 임상적 적용에 한계가 있었다. 따라서 상업적으로 이용 가능한 골형성단백질의 제조를 위해서는 다른 방법의 개발이 필요하였는데, 이렇게 하여 대두된 방법이 *E. coli*와

같은 세균을 사용하는 방법이다²⁶⁾. 현재까지 *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 제2, 4형 골형성단백질의 생산이 이루어졌으며, 그 효과가 여러 가지 실험으로 증명된 바 있다.

이번 연구의 목적은 백서 두개골의 결손 모델에서 *E. coli* 발현 시스템에 의해 생산된 제2형 재조합 골형성단백질의 골형성유도 효과를 평가하고, 활성이 있는 제2형 재조합 골형성단백질의 대량 생산 가능성을 모색하기 위함이다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 연구에서는 체중 250~300 g의 웅성 백서(Sprague-Dawley Rats) 48마리가 사용되었다. 동물 선택과 관리, 수술 계획안, 그리고 준비 등은 연세대학교 의과대학 임상연구의학센터의 기준을 따랐다.

2. 제2형 재조합 인간 골형성단백질 이식과 실험군 설정

E. coli 발현시스템에 의해 생산된 제2형 재조합 골형성단백질은 분말 상태로 만들어졌고, 이것을 증류수와 섞어 희석하여 0.1 mg/ml의 농도로 만들었다. 제2형 재조합 골형성단백질의 전달체로 멸균된 8 mm 직경의 흡수성 콜라겐 스폰지(Collatape®, Clacitek, Carlsbad, USA)를 사용하였으며, 여기에 제2형 골형성단백질 0.1 ml 용액을 적용하여 결손부 당 0.01 mg이 매식되도록 하였다. 제2형 재조합 골형성단백질 용액을 콜라겐 스폰지와 5분간의 결합 기간을 갖게 한 후에 이를 두개골 결손부에 적용하였다. 두개골 결손

부에 제2형 재조합 골형성단백질과 흡수성 콜라겐 스폰지(ACS)를 적용한 군을 실험군으로 설정하였으며, 아무것도 이식하지 않은 군을 음성대조군(sham surgery control), 흡수성 콜라겐 스폰지만을 이식한 군을 양성대조군(positive control)로 설정하였다. 각 군은 2주와 8주의 치유 기간 후 희생하여 관찰하였다. 각 실험군은 Table 1과 같다.

3. 수술 과정

실험 동물들은 Ketamine hydrochloride(Ketalar®, Yuhan Co, Seoul, Korea)와 Xylazine(Rumpun®, Bayer Korea Ltd, Seoul, Korea)을 4:1로 섞어 근육주사하여 마취하였으며(5 mg/kg), 수술 부위는 통상적인 침윤마취를 시행하였다. 실험 부위인 두부를 제모하였고 povidone iodine과 alcohol로 소독하였다. 두부에 시상면 절개를 시행한 뒤 두개골이 드러나도록 전층판막을 거상하였다. 직경 8 mm의 표준화된 원형 시편을 얻기 위해 외경 8 mm의 Trephine 드릴(Dentium Co, Korea)을 식염수 주수 하에 사용하였다. 결손부 형성 후 각각 실험 재료를 적용한 후 흡수성 봉합사(Monosyn, B. Braun, Melsungen, Germany)로 1차 봉합하였다.

4. 조직학 및 조직계측학적 분석

실험 동물들은 수술 2주와 8주 후 희생하였으며, 수술부위를 포함하여 블록으로 골을 떼어낸 뒤 10일간 10%의 neutral buffered formalin 용액에 고정하였다. 시편들은 14일간 5%의 개미산에서 탈회되었고 파라핀에 매입되었다. 80 µm 간격으로 5 µm의 두께로 절삭하였고, 시편의 정중앙

Table 1. Study design

Group (n)	Healing period	Treatment
Negative control (8)	2weeks	No material applied
Negative control (8)	8weeks	No material applied
Positive control (8)	2weeks	ACS alone
Positive control (8)	8weeks	ACS alone
Experimental (8)	2weeks	rhBMP-2 + ACS
Experimental (8)	8weeks	rhBMP-2 + ACS

부위를 선택하여 hematoxylin/eosin(H-E)으로 염색하고 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 계측지점은 그림 1과 같다.

조직계측학적 관찰은 전체 결손부에 대한 신생조직과 이식재에 의한 피개율(%), 신생골의 면적(mm^2), 증강이 이루어진 면적(mm^2)을 영상 분석 프로그램(Image-Pro plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA)을 이용하여 측정하였다.

결손부 폐쇄는 결손부 경계와 신생골 경계 사이의 거리를 측정하여 결정하였고 총 결손부위의 거리에 대한 %로 표현하였으며, 증강이 이루어진 부위는 신생골의 범위 내에 있는 모든 조직들 즉, 석회화된 골 및 지방 골수, 혈관 조직, 골수 그리고 잔여 생체물질 등을 모두 포함하여 측정하였다²⁴⁾.

5. 통계분석

조직계측학적 수치들은 평균과 표준편차($m \pm SD$), 실험조건과 치유기간과의 상관관계를 확인하기 위해 Two-way 분석법(two-way ANOVA)이 사용되었으며, 사후 검정 방법으로 post hoc t-test를 각 치유 기간에 있어 각기 다른 치료 방법의 차이를 분석하기 위해 사용되었다. paired t-test는 같은 실험 그룹에서 2주와 8주의 치유 기간의 차이에 대한 비교를 위해 사용되었다. 유의수준은 $p\text{-value} < 0.05$ 로 설정하였다.

결과

1. 임상적 관찰

임상적으로 실험부위의 치유는 양호하게 이루어졌다. 염증이나 알레르기, 재료의 노출, 수술부위 열개 등의 합병증은 없었다.

2. 조직학적 관찰

1) 음성대조군(sham-surgery)

수술 후 2주와 8주 모두 결손부의 대부분은 섬유성 결합 조직으로 채워져 있었으며, 염증세포들이 관찰되었다. 신생골 형성은 결손부 경계에서 미세하게 관찰되었으며 결손부의 중앙은 연조직의 함몰로 인해 붕괴되어 있었다. 2주에 비하여 8주에서는 신생골의 형성 정도나 결손부의 폐쇄 정도가 좀 더 일어난 양상이었지만 그 정도는 크지 않았다(Fig 2, 3).

2) 양성대조군(흡수성 콜라겐 스폰지 이식군)

2주째는 결손부에서 고밀도의 섬유성 결합조직이 관찰되었으며, 콜라겐 잔사들이 부분적으로 관찰되었다. 결손부 경계에서 제한적인 신생골 형성을 볼 수 있었으며, 결손부 주위 골과 신생골과의 경계는 비교적 명확하게 관찰할 수 있었다. 결손부에서 염증세포의 침윤은 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

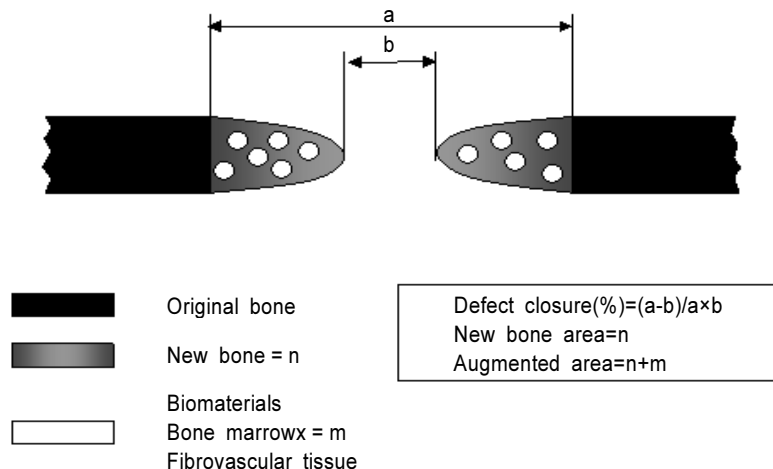


Figure 1. Schematic diagram of the calvarial osteotomy defect showing the histometric analysis

8주째에서는 2주와 거의 비슷한 양상을 보였으나 콜라겐 잔사를 관찰할 수 없어 콜라겐 스폰지가 완전히 흡수되었음을 알 수 있었다. 2주째와 비교하여 보았을 때 신생골의 형성이 결손부 변연에서 중앙으로 좀 더 이루어졌음을 관찰할 수 있었지만, 결손부의 많은 부분이 여전히 골조직이 아닌 결합조직으로 채워져 있었다(Fig. 5).

3) 실험군(흡수성 콜라겐 스폰지 + 제2형 재조합 인간 골형성단백질 이식군)

술 후 2주째에서 경막면을 따라 교직골이 관찰되었으며 결손부 전체에서 현저한 골 재생을 보였다. 특히 결손부 변연에서 다수의 조골세포가 관찰되어 골형성이 활발하게 일어나는 것을 알 수 있었으며 결손부의 중앙에서도 골조직 형성을 관찰할 수 있었다. 또한 특이할 만한 염증 소견 없이 콜라겐의 흡수가 진행되었고 흡수되지 않은 몇몇 콜라겐 스폰지 조각은 결합조직에 침범되지 않고 신생골 내에 매입된 양상

이었다(Fig. 6~8).

술 후 8주에서는 2주에 비해 더 많은 신생골 형성이 관찰되었으며 콜라겐 스폰지는 관찰되지 않았다. 신생골의 형상은 교직골에서 충판골로 대체되어 골의 성숙이 일어나고 있는 것으로 보였다. 또한 기존 골과 신생골 간의 경계도 명확하지 않았으며, 이로 보아 골의 혼화가 진행되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 9~11).

3. 조직계측학적 분석

조직계측학적 분석의 결과는 Table 2, 3, 4에 요약되어 있다. 결손부 폐쇄 정도는 술 후 2주에서 음성대조군 $13.53 \pm 3.58\%$, 양성대조군 $17.98 \pm 7.66\%$, 실험군 $85.9 \pm 16.25\%$ 으로 실험군과 양성대조군, 음성대조군이 통계적으로 유의성 있는 차이가 있었으며($p < 0.05$), 8주째 역시 음성대조군 $18.3 \pm 8.65\%$, 양성대조군 $21.88 \pm 8.34\%$, 실험군 100%로 실험군

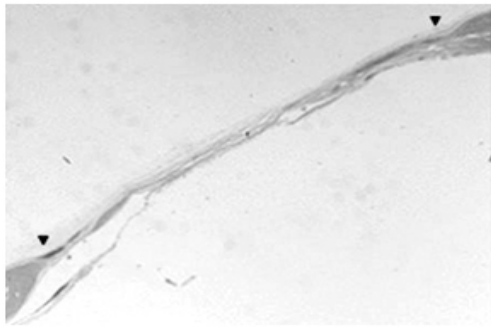


Figure 2. Representative photomicrographs of defect site receiving the sham surgery at 2weeks (arrow heads : defect margin ; HE stain, magnification X 10).



Figure 3. Representative photomicrographs of defect site receiving the sham surgery at 8weeks (arrow heads : defect margin ; HE stain, magnification X 10).

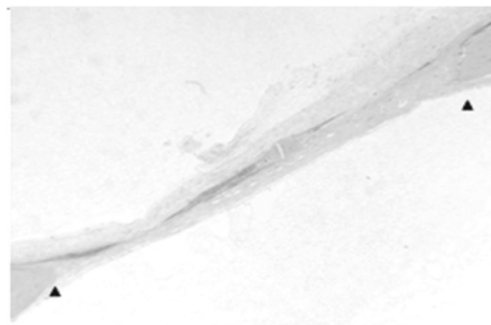


Figure 4. Representative photomicrographs of defect site receiving the positive control at 2weeks (arrow heads : defect margin ; HE stain, magnification X 10).

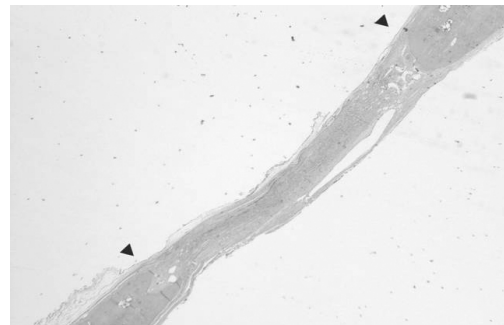


Figure 5. Representative photomicrographs of defect site receiving the positive control at 8weeks (arrow heads : defect margin ; HE stain, magnification X 10).

이 양성대조군, 음성대조군과 유의성 있는 차이를 보였다($p < 0.05$). 음성대조군과 양성대조군 사이에는 통계적으로 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 또한 8주 실험군은 2주

실험군에 비해 더 많은 결손부 폐쇄가 일어났음을 확인할 수 있었으며 이는 통계적인 유의성을 보였다($p < 0.05$). 특히할 만한 사항은 술 후 8주에서 실험군이 결손부의 완전한

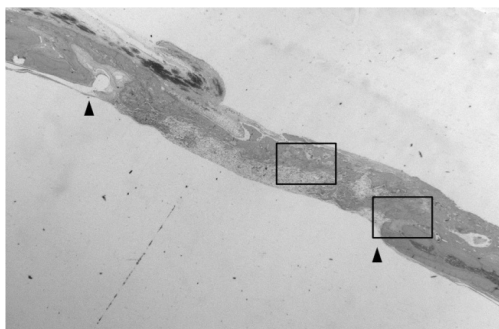


Figure 6. Representative photomicrographs of defect site receiving the experimental at 2weeks (arrow heads: defect margin ; HE stain, magnification X 10).

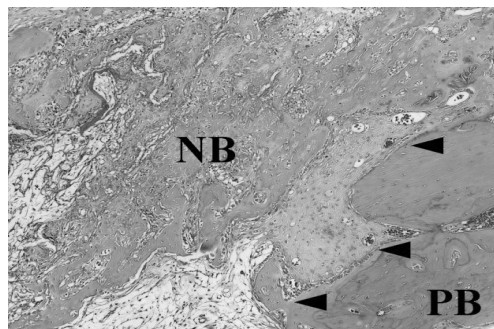


Figure 7. Representative photomicrographs of defect site receiving the experimental at 2weeks (arrow heads: defect margin, PB: pre-existing bone, NB: new bone ; HE stain, magnification X 100).

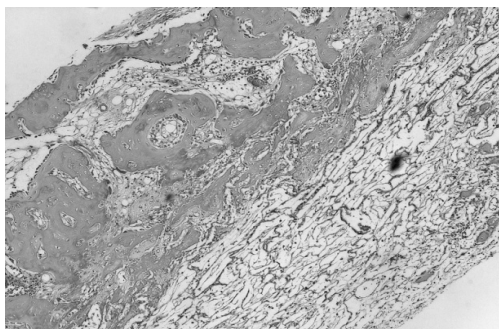


Figure 8. Representative photomicrographs of defect site receiving the experimental at 2weeks (central portion ; HE stain, magnification X 100)

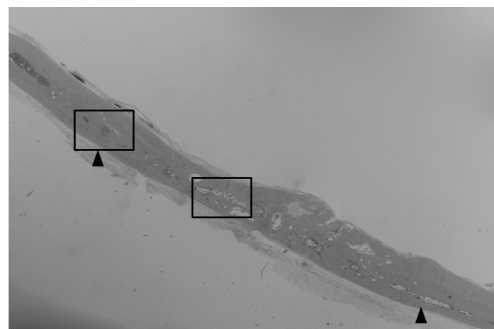


Figure 9. Representative photomicrographs of defect site receiving the experimental at 8weeks (arrow heads: defect margin ; HE stain, magnification X 10).

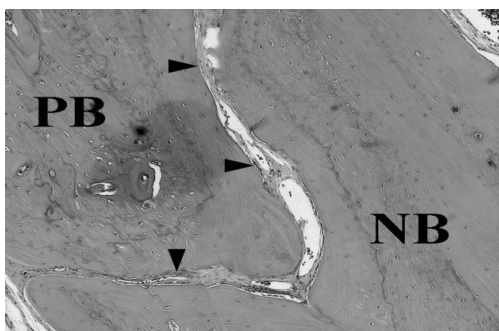


Figure 10. Representative photomicrographs of defect site receiving the experimental at 8weeks (arrow heads: defect margin, PB: pre-existing bone, NB: new bone ; HE stain, magnification X 100).

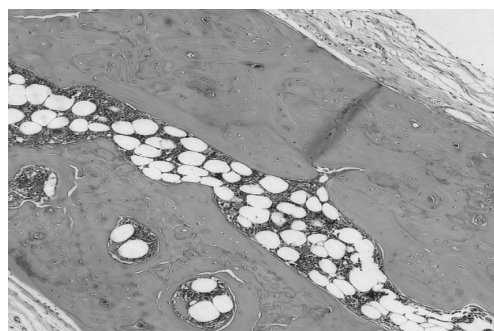


Figure 11. Representative photomicrographs of defect site receiving the experimental at 8weeks (central portion; HE stain, magnification X 100).

Table 2. Defect closure(group means \pm SD; n=8, %)

	2 weeks	8 weeks
Negative control	13.53 \pm 3.58	18.30 \pm 8.65
Positive control	17.98 \pm 7.66	21.88 \pm 8.34
Experimental	85.90 \pm 16.25* [¶]	100* [¶] [§]

*: Statistically significant difference compared with the negative control group (P<0.05)

¶: Statistically significant difference compared with the positive control group (P<0.05)

§: Statistically significant difference compared with that observed at 2 weeks (P<0.05)

Table 3. New bone area(group means \pm SD; n=8, mm²)

	2 weeks	8 weeks
Negative control	0.18 \pm 0.04	0.81 \pm 0.27 [§]
Positive control	0.23 \pm 0.13	0.46 \pm 0.07
Experimental	1.73 \pm 0.64* [¶]	7.4 \pm 1.56* [¶] [§]

*: Statistically significant difference compared with the negative control group (P<0.05)

¶: Statistically significant difference compared with the positive control group (P<0.05)

§: Statistically significant difference compared with that observed at 2 weeks (P<0.05)

Table 4. Augmented area(group means \pm SD; n=8, mm²)

	2 weeks	8 weeks
Negative control	0.22 \pm 0.07	0.89 \pm 0.32 [§]
Positive control	2.00 \pm 1.01*	3.5 \pm 0.30* [§]
Experimental	5.09 \pm 1.13* [¶]	9.8 \pm 1.56* [¶] [§]

*: Statistically significant difference compared with the negative control group (P<0.05)

¶: Statistically significant difference compared with the positive control group (P<0.05)

§: Statistically significant difference compared with that observed at 2 weeks (P<0.05)

폐쇄를 보였다는 점이다(Table 2).

신생골 형성 면적과 증강이 이루어진 부위의 면적은 결손부 폐쇄 결과와 유사한 경향을 보였다. 실험군은 2주째와 8주째에서 다른 군에 비해 더 많은 신생골양과 증감량을 보였으며, 이는 통계적인 유의성을 보였다. 또한 실험군에서 2주째와 8주째를 비교하여 보았을 때 8주째에서 신생골양과 증감량이 더 많이 일어났음을 관찰할 수 있었으며, 이는 통계적인 유의성을 나타내었다(Table 3, 4).

Two-way ANOVA 법으로 각 항목당 치유기간과 결손부 처치 방법이 미치는 영향 관계를 분석하였다. 결손부 처치 방법은 결손부 폐쇄, 신생골 형성, 골증감량 모두에 영향을 주었고, 치유기간은 결손부 폐쇄와 신생골 면적에 영향을 주었다(p<0.05).

고찰

조직 공학의 눈부신 발전이 이루어지면서 치과 영역에서도 제2형 재조합 골형성단백질(rhBMP-2), 혈소판 유래 성장인자(PDGF) 등 성장인자에 대한 연구가 활발하며, 임상적 적용이 제한적이나마 이루어지고 있다. 성장인자의 치료로 인해 기존의 방법과는 다른 기전으로 더 예지성 있는 조직 재생을 이룰 수 있을 것으로 기대되고 있으며 특히 골결손부에서 rhBMP-2의 적용은 골이식이나 골유도재생술을 대체할 훌륭한 치료법이 될 수 있다.

현재까지 대부분의 제2형 골형성단백질 합성은 CHO 세포 등의 포유류 세포를 이용하여 이루어졌다. 그러나 이와 같은 생산법은 대량 생산이 어렵고 생산단가가 비교적 높아

실제 임상에서 사용하기에는 적절하지 못하다는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 좀 더 경제적이고 쉬운 생산 방법들이 연구되고 있는데 이 중 하나가 *E. coli* 발현 시스템을 사용하는 것이다²⁶⁾. *E. coli*를 이용해 만들어진 제2형 골형성단백질은 당화가 되어있지 않다는 점에서 CHO 세포를 이용한 생산 방법에 의해 만들어진 제2형 골형성단백질과 다르지만, 생물학적 활성에서 차이는 없는 것으로 연구되었다²⁷⁾. 또한 C2C12 세포를 이용한 생물학적 활성을 평가해 보았을 때 그 활성이 입증되었다^{26,28)}.

이번 실험의 목적은 위와 같은 *E. coli* 발현 시스템에 의해 생산된 제2형 재조합 골형성단백질의 골형성 효과를 평가하는 데 있었다. 백서 두개골에 직경 8mm의 임계 크기의 결손부를 형성하고 실험군에는 제2형 재조합 골형성단백질을 흡수성 콜라겐 스폰지를 운반체로 하여 적용하고, 아무것도 처치하지 않은 것을 음성대조군, 콜라겐 스폰지만을 적용한 것을 양성대조군으로 설정하여, 실험 후 2주, 8주 후에 실험 동물을 희생하여 그 결과를 조직학적, 조직계측학적으로 비교하였다. 이번 실험에서 사용된 모델은 Takagi와 Urist²⁹⁾에 의해 발표된 모델에 그 근거를 두며, 백서두개골 결손부위의 임계크기는 상대적으로 접근이 쉽고 간편하며 재현성이 뛰어나다. 이 모델은 생체적용재료의 골 재생성효과를 평가하는데 편리하다는 장점을 갖는다.

골형성을 예지성 있게 이루기 위해서는 제2형 재조합 골형성단백질이 적절한 전달체에 함유되어 이식되어야 하는데 각기 다른 임상적 상황이나 결손부의 외형 크기에 따라 전달체에 요구되는 조건이 다르다³⁰⁾. 일반적으로 전달체로 사용되는 재료는 결손부를 구조적으로 지지할 수 있어야 하며, 작용을 일으키기에 충분한 농도와 용량을 적절한 시간에 걸쳐 유리할 수 있어야 한다. 또한 전달체는 전구세포나 혈관이 이주하고 침투하여 오는 것을 허용해야 하며, 궁극적으로 골조직으로 대체되어야 한다. 이번 실험에서는 흡수성 콜라겐 스폰지를 제2형 재조합 골형성단백질의 전달체로 사용하였는데 앞선 연구들에서 정형외과적 영역과 구강 영역에서 골유도 효과와 치유 효과가 입증된 바 있다. 예컨대 Ahn 등³¹⁾은 제4형 재조합 골형성단백질의 골 재생 효과에 흡수성 콜라겐 스폰지가 β -TCP보다 더 우수한 운반체라고 발표하였으며, Pang 등³²⁾은 흡수성 콜라겐 스폰지 또는 β -TCP 운반체를 이용한 제4형 재조합 골형성단백질의 사용은 백서두개골 결손부위의 골 형성유도에 중요한 잠재력을 가지고 있으며 흡수성 콜라겐 스폰지와 β -TCP는 제4형 재

조합 골형성단백질의 운반체에 매우 효과적일 수 있다고 발표하였다. 그러나 흡수성 콜라겐 스폰지는 근육이나 다른 연조직에 의한 압력이 가해질 때 공간 유지가 되지 않아 그 효과가 떨어지는 단점이 있다고 보고되기도 하는데, Martin 등의 연구에 따르면 원숭이의 척추 유착 모델에서 콜라겐 스폰지만으로 제2형 재조합 골형성단백질을 이식했을 경우 골형성양이 매우 제한적이었다고 했다³³⁾. 이번 실험에서는 연조직의 압력으로 인해 골유도가 저해되는 현상은 관찰되지 않았고, 쥐나 토끼의 피하층에 제2형 골형성단백질과 콜라겐 스폰지를 함께 이식한 실험에서 매식 부위에 이소성 골형성이 이루어지는 것으로 보아 주위 조직으로부터 가해지는 압력의 차이가 골형성 정도와 유무에 영향을 주는 것으로 보인다³⁴⁾. 따라서 제2형 재조합 골형성단백질의 골형성능에 대해서 여러 가지 다른 결손부 모델에서의 평가가 더 필요할 것으로 사료된다.

현재까지 최적의 골재생 효과를 나타내는 제2형 재조합 골형성단백질 농도에 대해 많은 실험들이 있었지만 명확하게 규명되지는 않았다. 이번 실험과 같은 백서 두개골 모델을 사용한 Pang 등의 실험에 따르면 0.05 mg/ml, 0.025 mg/ml 농도의 제4형 재조합 골형성단백질을 흡수성 콜라겐 스폰지와 β -TCP를 전달체로 하여 적용하였을 때 농도 간 골재생 양의 차이는 없었다고 했다³²⁾. 하지만 다른 연구에 따르면 제2형 골형성단백질의 농도를 10, 50, 100, 200 mg/L로 사용했을 때 농도에 의존적으로 간엽 줄기 세포의 증식이 촉진되었으며, 100 mg/L와 200 mg/L로 사용했을 때 골아세포의 분화가 촉진되었다고 했다³⁵⁾. 이번 연구에서는 0.1 mg/ml 농도의 제2형 재조합 골형성단백질을 사용하여 골재생 효과를 평가하였으며 음성대조군과 양성대조군에 비해 통계적으로 유의성 있는 현저한 골재생 효과를 보였다. 특히 실험군 8주에서 골결손부의 완전한 폐쇄를 볼 수 있었으며, 이것은 음성대조군($18.30 \pm 8.65\%$)과 양성대조군($21.88 \pm 8.34\%$)과 비교해 보았을 때 큰 차이를 보였다. 또한 실험군 2주에서 결손부 폐쇄 정도, 신생골 형성량, 골중대량 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이는 것으로 보아 제2형 재조합 골형성단백질은 초기에 빠르게 작용하는 것으로 사료되었다.

결론적으로 *E. coli*로부터 생산된 제2형 재조합 골형성단백질을 0.1 mg/ml의 농도로 흡수성 콜라겐 스폰지를 전달체로 하여 골결손부에 적용하는 것은 신생골 형성에 효과적인 것으로 보인다. 또한 제2형 재조합 골형성단백질을 기준

의 방법보다 낮은 가격으로 대량 생산하면서 골재생 효과가 감소하지 않는 생산 방법으로 *E. coli* 발현 시스템은 실용 가능성이 있을 것으로 사료된다. 앞으로 *E. coli* 발현 시스템에서 생산된 제2형 재조합 골형성단백질의 농도를 달리하여 그 효과를 검증하거나, 다른 전달체를 사용하여 각각의 전달체 간의 차이를 밝히려는 실험들이 계속되어야 한다.

참고문헌

1. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
2. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971;50:1392-406.
3. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.
4. Reddi AH, Anderson WA. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *J Cell Biol* 1976;69:557-572.
5. Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 1992;130:1318-1324.
6. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, et al. Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1991;6:1373-1385.
7. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994;127:1755-1766.
8. Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, et al. Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:1352-1358.
9. Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J Dent Res* 1999;78:1624-1633.
10. Takuwa Y, Ohse C, Wang EA, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:96-101.
11. Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 1993;9:57-71.
12. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:366-371.
13. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 1992;267:20352-362.
14. Aldinger G, Herr G, Kusswetter W, et al. Bone morphogenetic protein: a review. *Int Orthop* 1991;15:169-177.
15. Alam I, Asahina I, Ohmamiuda K, Enomoto S. Comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics impregnated with rhBMP-2 as bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 2001;54:129-138.
16. Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, et al. Enhanced healing of segmental tibial defects in sheep by a composite bone substitute composed of tricalcium phosphate cylinder, bone morphogenetic protein, and type IV collagen. *J Biomed Mater Res* 1996;32:505-512.
17. King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodontal Res* 1998;33:226-236.
18. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7599-7603.
19. Urist MR, Lietze A, Dawson E. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* 1984;277-280.
20. Urist MR, Nilsson O, Rasmussen J, et al. Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein(BMP) beta tricalcium phosphate(TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1987;295-304.
21. Jovanovic SA, Hunt DR, Bernard GW, et al. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clin Oral Implants Res* 2007;18:224-230.

22. Sigurdsson TJ, Fu E, Tatakis DN, et al. Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:367-374.
23. Han DK, Kim CS, Jung UW, et al. Effect of a fibrin-fibronectin sealing system as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2005;76:2216-2222.
24. Hong SJ, Kim CS, Han DK, et al. The effect of a fibrin-fibronectin/beta-tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials* 2006;27:3810-3816.
25. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2220-2224.
26. Choi KH, Moon KO, Kim SH et al. Purification and biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced by E.coli expression system. *J Korean Acad Periodontol* 2008;38:41-50.
27. Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, et al. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2002;94:185-194.
28. Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, et al. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:295-299.
29. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 1982;196:100-109.
30. Lynch SE, Marx RE, Nevins M, Wisner-Lynch LA. *Tissue Engineering - Application in oral and maxillofacial surgery and periodontics*, 2nd Edition. Chicago : Quintessence Publishing Co, Inc 2008:163-165.
31. Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2003;74:787-797.
32. Pang EK, Im SU, Kim CS, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol* 2004;75:1364-1370.
33. Martin GJ Jr, Boden SD, Marone MA et al. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a nonhuman primate : Important lessons learned regarding dose, carrier, and safety. *J Spinal Disord* 1999;12:179-186.
34. H.-P. Hsu, J.M. Zanella, S.M. Peckham et al. Comparing Ectopic Bone Growth Induced by rhBMP-2 on an Absorbable Collagen Sponge in Rat and Rabbit Models. *J Orthop Res* 2006;24:1660-1669.
35. Yang X, Fang J, Luo Y. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and osteogenic agents on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2007;21:140-144.