

Tissue Engineering of the Intervertebral Disc with Cultured Nucleus Pulposus Cells Using Atelocollagen Scaffold and Gene Therapy

Hak-Sun Kim, M.D. , Kwang-Il Lee, M.D., Hyang Kim, M.D., Un-Hye Kwon, M.D., Mi-Ran Nam, M.D.
Ju-Woong Jang, M.D., In-Je Cho, Boram Kim, M.D. , Hwan-Mo Lee, M.D. , Seong-Hwan Moon, M.D.

J Korean Soc Spine Surg 2010 Mar;17(2):49-56.

Originally published online June 30, 2010;

doi: 10.4184/jkss.2010.17.2.49

Korean Society of Spine Surgery

Department of Orthopaedic Surgery, Ewha Womans University College of Medicine
#911-1 Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul, 158-710, Korea Tel: 82-2-2646-6808 Fax: 82-2-2646-6804

©Copyright 2010 Korean Society of Spine Surgery

pISSN 2093-4378 eISSN 2093-4386

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://www.krspine.org/DOIx.php?id=10.4184/jkss.2010.17.2.49>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Tissue Engineering of the Intervertebral Disc with Cultured Nucleus Pulposus Cells Using Atelocollagen Scaffold and Gene Therapy

Hak-Sun Kim, M.D.^{*}, Kwang-Il Lee, M.D.^{††}, Hyang Kim, M.D.^{**}, Un-Hye Kwon, M.D.^{*}, Mi-Ran Nam, M.D.^{**†}
Ju-Woong Jang, M.D.[†], In-Je Cho^{*}, Boram Kim, M.D.^{*}, Hwan-Mo Lee, M.D.^{*}, Seong-Hwan Moon, M.D.^{**†}

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine^{*}

Korea Bone Bank Co., Ltd.[†], Brain Korea 21, Medical Science Graduated School^{††}

Study Design: This is an in-vitro experiment using rabbit intervertebral disc (IVD) cells and growth factors.

Objectives: We wanted to determine the effect of types I, and II atelocollagen and growth factor gene therapy for matrix regeneration of rabbit IVD cells.

Summary of the Literature Review: Adenovirus-mediated growth factor gene therapy is efficient for matrix regeneration of the IVD. Atelocollagen has provided a favorable environment for matrix synthesis. However, a combined approach using gene and cell therapy in an atelocollagen scaffold has not yet been attempted.

Materials and Methods: Rabbit IVD cells were transduced with Ad/TGF- β 1 and Ad/BMP-2. The cells were then implanted to the atelocollagen scaffold. The [methyl-³H]thymidine incorporation for DNA synthesis and the [³⁵S]sulfur incorporation for proteoglycan synthesis were measured. RT-PCR was performed for assessing the aggrecan, collagen type I, collagen type II and osteocalcin mRNA expressions.

Results: The rabbit IVD cells with Ad/TGF- β 1 and that were cultured in type I atelocollagen showed a 130% increase in new proteoglycan synthesis, while the rabbit IVD cells with Ad/TGF- β 1 and that were cultured in type II atelocollagen showed a 180% increase in new proteoglycan synthesis ($p < 0.05$). The rabbit IVD cells with Ad/BMP-2 and that were cultured in type I atelocollagen showed a 70% increase in new proteoglycan synthesis, while the rabbit IVD cells with Ad/BMP-2 and that were cultured in type II atelocollagen showed a 95% increase ($p < 0.05$). Rabbit IVD cells with Ad/TGF- β 1 and Ad/BMP-2 and that were cultured in type I and II atelocollagen demonstrated increased collagen type I and II mRNA expressions without an osteocalcin mRNA expression ($p < 0.05$).

Conclusion: Cell and gene therapy in an atelocollagen scaffold provided a efficient mechanism for chondrogenic matrix regeneration of rabbit IVD cells.

Key words: Intervertebral disc, Collagen, Scaffold, TGF- β 1, BMP-2

서론

추간판 변성과 관련한 척추 질환은 의료비, 노동력 손실을 포함한 심각한 사회경제학적 비용을 우리 사회에 부담시키고 있다.¹⁾ 현재까지 퇴행성 척추 질환의 치료는 주로 신경 증상이 있는 경우 신경 감압을 위해 병변 부위를 절제하거나 요통이 심한 경우 가동 척추 관절을 유합 혹은 인공 관절로 대체하는 대증적 치료가 대부분이었다.^{2,3)} 이에 반하여 추간판 퇴행을 방지 혹은 회복 시키기 위하여 다양한 생물학적 방법이 적용되고 있다. 이에는 성장 인자 치료^{4,5)} 세포 치료^{6,7)} 유전자 치료^{8,9)} 조직공학적 재생^{10,11)} 등의 방법이 소개 되었다. 이러한 생물학적 방법들은 개개의 방법만으로는 충분한 효과를 얻기가 힘들어 두세 가지의 방법을 같이 적용하면 더 효율적인 치료법이 될 수가 있다. 즉 조직 결손이 있는 경우, 대체해야 할 조직이 큰 경우는 세포 배양,

Received: December 9, 2009

Revised: March 11, 2010

Accepted: June 1, 2010

Published Online: June 30, 2010

Corresponding author: Seong-Hwan Moon, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine
134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

TEL: 82-2-2228-2188, **FAX:** 82-2-363-1139

E-mail: shmoon@yuhs.ac

"This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited."

본 연구는 부분적으로 연세대학교 일반교수연구비 (#6-2002-0060), Brain Korea 21에 의해 지원되었음.

증폭만으로는 조직 재생이 불가능 할수 있는데 이런 경우 세포 치료와 지지체를 같이 이용하여 조직 결손을 해결할 수 있다.¹²⁾ 이뿐만 아니라 지지체 속에서 세포를 증식 시키고 원하는 표현형질로 분화시키기 위하여 성장 인자, 성장 인자 유전자 치료가 첨가되면 세포, 지지체, 그리고 생물학적 자극을 함께 포함하는 이상적인 방법이 될 것이다.¹³⁾

척추 추간판은 바깥쪽의 섬유륜과 중앙부의 수핵으로 나누어지며 수핵부는 단백다당과 교원질로 구성된 고유의 기질로 강력한 삼투압을 유발하여 척추관절에 체중 지탱과 가동성을 부여한다.^{14,15)} 유전적 환경적 요인 등으로 추간판의 단백다당과 제 2형 교원질이 감소되고 이로 인하여 추간판내 수분압이 감소하고 추간판 높이를 유지할 수 없어 결국 척추 후관절의 퇴행도 발생하게 된다.¹⁶⁾ 추간판 변성을 예방 혹은 치료하기 위해서는 추간판 수핵부의 기질을 원상 회복하는 것이 가장 중요하다. 그러므로 이제까지의 여러 가지 생물학적 접근법도 주로 수핵부의 단백다당 생성 자극, 파괴 방지에 역점을 두고 있다.^{4,7,17)}

조직 공학적 재생에서 세포, 성장 인자와 함께 지지체는 가장 중요한 부분을 담당한다. 생체 적합성, 낮은 항원성, 탁월한 조직 재생력, 견고성 등이 지지체가 갖추어야 할 특성들이다.^{12,13)} 척추 추간판의 재생을 목적으로도 많은 지지체가 개발, 소개 되었으며 각각이 특유의 장단점을 가지면서 추간판 기질을 재생을 유도하고 있다.^{10-13,18)} 이 중에서 아텔로콜라겐은 생체적합성, 저항원성, 기질재생 능력 등 많은 장점을 가지고 있어 특히 추간판 조직 재생이 많은 연구가 행해졌다.¹⁸⁻²⁰⁾

그럼에도 불구하고 세포, 유전자 치료, 지지체 등을 함께 사용하여 추간판 조직 재생을 시도한 연구는 없었다. 그리하여 본 연구에서는 토끼의 추간판 수핵 세포에 성장 인자 유전자를 전달하고 이를 제 1형, 제 2형 아텔로콜라겐 지지체에 배양하여 단백다당 생산, 연골형 표현형 발현을 알아보았다.

연구 대상 및 방법

1. 세포 배양

뉴질랜드 흰 토끼(3.5kg, 암컷)에게서 추간판 조직을 채취하고, 섬유륜에 둘러싸인 수핵부를 분리하였다. 채취된 추간판의 수핵 세포는 순차적 효소 소화법에 의해 조직으로부터 분리되었다. 먼저 세척된 추간판 수핵 부위를 잘게 썰고, Hams F-12 배지와 1% v/v penicillin, streptomycin, nystatin(all antibiotics form GIBCO-BRL, Grand Island, NY)에 0.4% w/v protease, 0.004% w/v DNase(Sigma, ST. Louse, MO, Germany)를 첨가하여 37°C에서 60분간 소화시켰다. Hams F-12 배지로 세척 후 0.025% w/v collagenase type II, 0.004% w/v DNase(Sigma, St. Louse, MO, Germany)를 첨가하여 37°C에서 3시간동안 소화

시켰다. 분리된 추간판 수핵 세포는 Hams F-12 배지로 2회 세척 후, Nylon 여과지(Falcon, Franklin Lakes, NJ, pore size 75 μ m)를 사용하여 부유 조직을 제거하였다. 수핵 세포는 10% 우태아 혈청(Fetal bovine serum, GIBCO-BRL, Grand Island, NY), 1% v/v antibiotic-antimycotic, 25 μ g/ml ascorbic acid가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium and Hams F-12 medium(DMEM/F-12, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 사용하여 T-25 flask(NUNC, Rockilde, Denmark)에서 37°C, 5% CO₂하에서 배양하였다. 3일 간격으로 배지를 갈아주었으며 세포는 3주간 배양되었다.

2. 아텔로콜라겐 지지체의 제작

각각 1%의 제 1형, 2형 아텔로콜라겐(Regenmed, Seoul, Korea) 56 μ l를 96-well plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ)에 붓고 -70°C에서 동결시킨 후, -50°C에서 냉동 건조시켰다. 제작된 다공성의 교원질 물질들은 50mM의 1-ethyl-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액에서 24시간 동안 교차 결합되었다. 이렇게 얻어진 지지체는 초음파 분쇄기를 사용하여 증류수로 세척한 후, -50°C에서 다시 냉동 건조 처리를 하였다.

3. 아데노바이러스 TGF- β 1, BMP-2 cDNA 준비

E1 및 E3 유전자 부분이 결여돼 성장이 제한된 제 5형 아데노바이러스(Ad)를 사용하였다. E1 유전자 부위에 치료 유전자로 TGF- β 1 유전자(Ad/TGF- β 1) 와 BMP-2유전자(Ad/BMP-2)를 재조합 하였다. 재조합된 유전자는 cytomegalovirus promotor에 의해 강제 발현되며, 재조합된 아데노바이러스는 293 세포에서 증식하였으며, CsCl 밀도 구배법으로 분리 정제하여, 1 \times 10¹² paricles/ml의 농도로 1.5ml 원심분리 tube에 등분하여 -70° C 냉동고에 저장하였다. 또한 바이러스의 particle 수와 감염 가능한 particle 수는 1:100의 비율로 결정하여 실험을 수행하였다.

4. 시험관내 아데노바이러스 감염 술식 및 실험군

배양된 추간판 수핵 세포의 배양액을 제거한 후 D-PBS로 두 번 세척하여, 대조군은 5% FBS가 포함된 DMEM-LG 배양액만을, 실험군에는 치료 유전자가 재조합된 Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2를 각각 5% FBS가 포함된 DMEM-LG 배양액으로 희석하여 세포에 첨가하였다. 아데노바이러스의 농도는 각 군당 75MOI가 되도록 첨가하였다. 재조합 아데노바이러스를 첨가한 추간판 수핵 세포는 5%의 CO₂를 포함한 37° C 습윤 배양기에서 24시간 추가 배양하였다. 추가 배양한지 24시간이 지난 후, 유전자 전달된 추간판 세포를 0.25% Trypsin, 1mM EDTA로 배

양 접시에서 분리하여 세포수를 센 후, 각각을 5×10^5 cells/ml이 되도록 배양액으로 희석하였다.

5. 아텔로콜라겐 지지체로의 세포 이식

배양된 토끼의 추간판 수핵 세포를 Trypsin/EDTA(Calbiochem, La Jolla, CA) 처리를 하여 Culture flask로부터 떼어냈다. 아텔로콜라겐 지지체는 에탄올 소독 처리 시행하고 DMEM/F-12 배지에 보관하였으며 96-well plate(Falcon, Franklin Lakes, NJ)에 아텔로콜라겐 지지체를 바닥부위에 깔아 놓았다. 유전자 조작을 하지 않은 대조군, Ad/TGF- β 1(75 MOI) 처리군, Ad/BMP-2(75 MOI) 처리군으로 나눈 추간판 수핵 세포를 마이크로 파이펫을 사용하여 최대한의 수분을 제거한 후, 세포 생존성 검사²¹⁾ 및 세포밀도를 계산한 후 5×10^5 세포/ml의 밀도로 표면 장력의 효과를 이용하여 지지체의 중심부에 이식했다. 세포 배양액은 10% FBS, 25 μ g/ml ascorbic acid, 1% antibiotics가 혼합된 DMEM/F-12를 사용하고 37°C, 5%의 CO₂ 하에서 배양하였다. 배지는 2일 간격으로 교체되었고 총 7일간 배양하였다.

6. 세포 증식 반응 측정

토끼의 추간판 수핵 세포가 이식된 아텔로콜라겐 지지체에 [methyl-³H] thymidine 5 μ Ci/ml(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 첨가된 배지를 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포가 이식된 지지체를 D-PBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco-BRL, Grand island, NY)로 조심스럽게 씻어내고 scintillation vial에 담아, liquid scintillation cocktail 용액을 3ml 첨가하여 섞은 후, 24시간 동안 상온에서 건조시켰고 beta scintillation counter(Packard, Downers Grove, IL)를 이용하여 DNA의 양을 측정하였다.

7. 신생 당단백 생성 측정

지지체에 이식된 세포들을 [³⁵S] sulphur 20 μ Ci/ml(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 첨가된 배양액에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 상층액은 분리하여 -70°C에 보관하고, 세포에는 4M guanidine hydrochloride, 50mM sodium acetate(pH5.8) 그리고 0.1M 6-aminohexanoic acid, 10mM EDTA(Ethylemedianeimetaacetic Acid Disodium Salt), 5mM Benzamidine hydrochloride, 10mM N-tehylmaleimide, 0.5mM phynylmethyl-sulfonyl fluoride가 혼합된 proteinase inhibitor를 첨가하여 4°C에서 48시간 동안 당단백을 추출하였다. 방사선 동위원소 [³⁵S]로 표식된 당단백의 정량적인 분석을 위해 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 세포와 -70°C에 얼려두었던 상층액과 함께 통과시켜 scintillation vial에 순차적으로 용출하였다. 2, 3, 4번째 용출된 용액에 6ml의 liquid scintillation cocktail(Beckman, Fullerton, CA) 용액을 첨가하여 섞은 후, 24시간 동안 상온에서 방치하였고, Beta scintillation counter를 통해 당단백 생성량을 측정하였다.

8. Aggrecan, 제 1형, 2형 교원질, osteocalcin의 mRNA 발현 검사

RNeasy mini kit(QIAGEN, Maryland, USA)를 이용하여 Total RNA를 분리하였다. 토끼의 추간판 수핵 세포의 Total RNA 1 μ g와 oligo(dT) 1 μ l(Invitrogen, USA, 0.5 μ g/ μ l)와 3차 증류수를 혼합하여 50 μ l로 혼합한 후, AccuPower RT-premix(Bioneer, 대전, 한국)에 넣어 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)을 하였다. 42°C에서 60분, 94°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하였고, 합성한 cDNA를 에탄올로 정제하여, 최종 부피 20 μ l를 만들었다. 이중 각각의 cDNA 1 μ l를 취하여, sense primer와 antisense primer 10pmole, 3차 증

Table 1. Sequences of primers used for PCR amplification of cDNA.

Gene	Direction	Sequence (5'→3')	Product size
Aggrecan	Forward	AGG TGT TGT GTT CCA CTA TC	378 bp
	Reverse	GTC ATA GGT CTC GTT GGT GT	
Collagen type I	Forward	AGA AGG AGT AAC CTC CAA GG	321 bp
	Reverse	ATG ACC AAA GGT GCA ATA TC	
Collagen type II	Forward	GCA CCC ATG GAC ATT GGA GG	367 bp
	Reverse	GAC ACG GAG TAG CAC CAT CG	
Osteocalcin	Forward	AAG AGA TCA TGA GGA GCC TG	420 bp
	Reverse	AGG AAA CAA GCA CTG TGC AT	
Beta-actin	Forward	GCC ATC CTG CGT CTG GAC CT	228 bp
	Reverse	GTG ATG ACC TGG CCG TCG GG	

류수를 혼합하여 10 μ l의 반응용액을 만들어 Sapphire PCR-premix(Sapphire, USA)에 넣고, RT(Real Time)-PCR을 시행하였다. PCR 생성물은 2% agarose젤에서 전기영동을 통해 각 유전자의 발현을 검출하였다. RT-PCR에 대한 대조군으로 beta actin을 사용하였으며 TINA 2.0e program을 통해 각각의 발현 정도를 비교 분석하였다(Table 1).

9. 아테로콜라겐에 이식된 추간판 세포의 형태 관찰

세포 배양한 지 7일째, 주사 전자 현미경을 통하여 다공성의 아테로콜라겐 지지체 내에 이식된 토끼의 추간판 수핵 세포를 관찰함으로써, 지지체에서의 추간판 세포 생존성 및 기질 생성의 여부를 분석하였다.

10. 통계

자료는 SPSS(SPSS Inc. Chicago IL)를 이용하여 처리하였으며 One-way ANOVA 및 Fisher's protected LSD post-hoc test로

실험군간 비교하였다. 유의 수준은 0.05로 하였다.

결과

1. 단백질다당 생성

제 1형 아테로콜라겐에 배양하고 Ad/TGF- β 1로 처리한 추간판 세포군에서 유전자 전달을 하지 않은 대조군에 비해 배양 7일째 새로운 단백질다당 생성이 130% 증가하였고 ($p < 0.05$) 제 2형 아테로콜라겐에 배양하고 Ad/TGF- β 1로 처리한 추간판 세포군에서는 대조군에 비해 새로운 단백질다당 생성이 180% 증가하였다. ($p < 0.05$)

제 1형 아테로콜라겐에 배양하고 Ad/BMP-2로 처리한 추간판 세포군에서 유전자 전달을 하지 않은 대조군에 비해 배양 7일째 새로운 단백질다당 생성이 70% 증가하였고 ($p < 0.05$) 제 2형 아테로콜라겐에 배양하고 Ad/BMP-2로 처리한 추간판 세포군에서는 대조군에 비해 새로운 단백질다당 생성이 95% 증가하였다. ($p < 0.05$) (Fig. 1)

2. Aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질, osteocalcin mRNA 발현

제1형 아테로콜라겐에 배양하고 Ad/TGF- β 1 Ad/BMP-2 처리한 추간판 세포군에서는 aggrecan mRNA 발현은 큰 차이가 없으나 제 1형 교원질 mRNA는 Ad/TGF- β 로 처리한 군에서 대조군에 비해 250% 발현 증가가 있었다. ($p < 0.05$) 제 2형 교원질 mRNA의 경우 대조군에 비해 Ad/TGF- β 로 처리한 경우 700% 발현 증가가 있었고 Ad/BMP-2로 처리한 경우는 460% 발현증가가 있었다. ($p < 0.05$) 이에 반해서 어느 경우에도 osteocalcin mRNA 발현은 관찰되지 않았다.

제 2형 아테로콜라겐에 배양하고 Ad/TGF- β , Ad/BMP-2

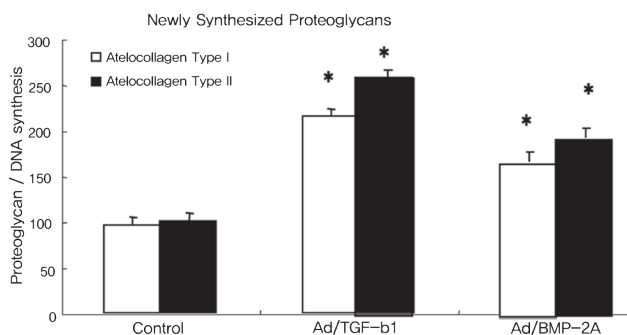


Fig. 1. Proteoglycan synthesis([S35] incorporation) normalized by DNA synthesis([H3] incorporation) in rabbit nucleus pulposus cells seeded on atelocollagen type I and II scaffolds for culture period of 1 week. Ad/TGF-b1, Ad/BMP-2 (75MOI) were administered. Control is only cell seeded scaffold without virus infection. (* $P < 0.05$)

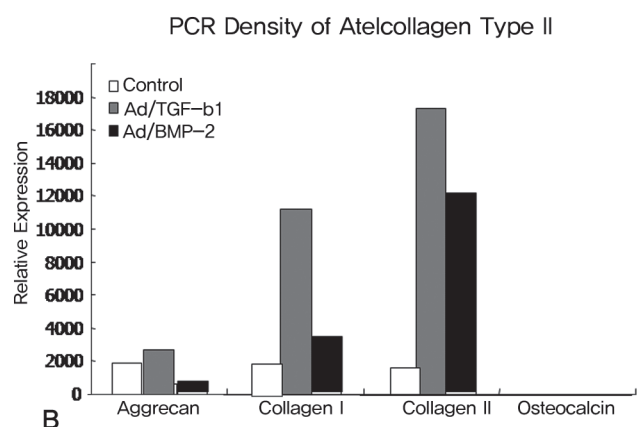
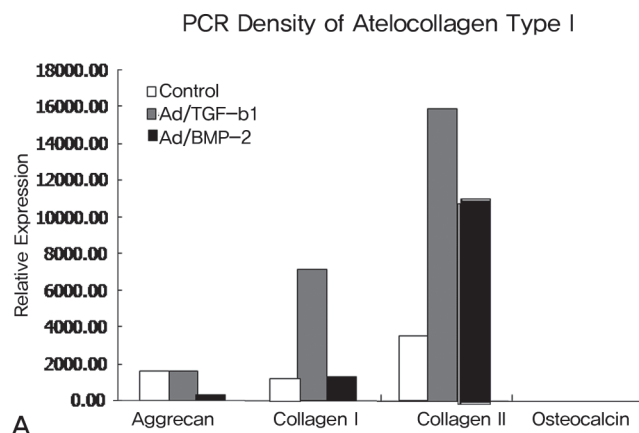


Fig. 2. Densitometry of RT-PCR products by beta-actin expression. (A) mRNA expression of aggrecan, collagen I, II, osteocalcin for 1 week culture in atelocollagen type I matrix and (B) atelocollagen type II.

로 처리한 추간판 세포군에서는 aggrecan mRNA 발현이 Ad/TGF- β 에서는 약간 증가(40%)하였고 Ad/BMP-2의 경우에도 다소 감소하였으나 제 1형 교원질 mRNA는 Ad/TGF- β 로 처리한 군에서 대조군에 비해 480% 발현 증가가 있었으며 Ad/BMP-2로 처리한 군에서는 80% 발현 증가가 있었다. ($p < 0.05$) 제 2형 교원질 mRNA의 경우 대조군에 비해 Ad/TGF- β 로 처리한 경우 800% 발현 증가가 있었고 Ad/BMP-2로 처리한 경우는 520% 발현 증가가 있었다. ($p < 0.05$) 이에 반해서 어느 경우에도 osteocalcin mRNA 발현은 관찰되지 않았다. (Figs. 2, 3)

3. 주사 전자 현미경 관찰

아테로콜라겐 지지체를 주사 전자 현미경으로 관찰한 결과, 각각의 지지체의 다공성 구조를 확인할 수 있었고 아테로콜라겐 지지체 내에서 일주일간 Ad/TGF- β , Ad/BMP-2로 처리한 추간판 세포를 배양한 결과, 이식된 대부분의 추간판 세포들은 다공성의 지지체에 안전하게 부착되었으며 세포의 기질을 수핵 세포 표면에 생성한 것을 전자 현미경 상으로 관찰할 수 있었다. (Fig. 4)

고찰

콜라겐은 피부 세포조직을 구성하는 세포로 구성된 일종의 섬유질 단백질로 알려져 있는데 이 물질이 체내로 주입되면 항원으로 작용하여 면역반응을 일으키며 결국 이식된 조직의 거부 반응이 일어날 수 있다. 그러나 항원성을 가지는 물질을 제거하고 나면 이로 인해 발생할 수 있는 자가 면역 반응을 방지하는 것이 가능하여 지지체와 세포 이식을 하였을 경우 거부 반응 없

이 장기 생존이 가능하다.¹⁸⁾ 아테로콜라겐은 항원성을 감소시킨 지지체로서 거부 반응을 줄일 수 있고 원하는 다공성을 얻을 수 있으며, 제 1형 교원질과 제 2형 교원질로 이루어져 있으며 그 구성 성분을 바꿀 수 있기 때문에 이상적인 지지체로 소개되고 있다.¹⁸⁻²⁰⁾ 본 연구에서는 제 1, 2형 아테로콜라겐 지지체에 유전자 전달한 추간판 세포를 배양하여 지지체의 성분에 따른 기질 생성 반응, 전달된 유전자에 따른(TGF- β 1, BMP-2 cDNA) 단백질 생성, 기질을 구성하는 aggrecan, 제 1형 교원질, 제 2형 교원질 mRNA의 발현을 보았다. 제 1형 아테로콜라겐 지지체 보다는 제 2형 아테로콜라겐 지지체가 향상된 단백질 생성 및 aggrecan, 제 2형 교원질 mRNA 발현을 보였다. 제 1, 2형 아테로콜라겐 모두에서 Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2로 유전자 전달하여 기질 생성을 자극하여도 aggrecan mRNA 발현은 거의 차이가 없었다. 이에 반하여 제 2형 아테로콜라겐의 경우는 제 1형 아테로콜라겐에 비해 Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2로 자극하였을 때 현저히 증가된 단백질 생성, 제 1형, 제 2형 교원질 mRNA

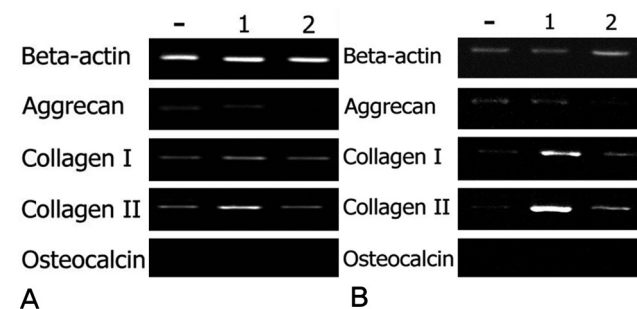


Fig. 3. (A) RT-PCR of beta-actin, aggrecan, collagen type I, collagen type II, and osteocalcin on atelocollagen type I matrix for culture period of 1 week, **(B)** atelocollagen type II.

- : Control (Only cell), 1 : Ad/TGF- β 1, 2 : Ad/BMP-2t

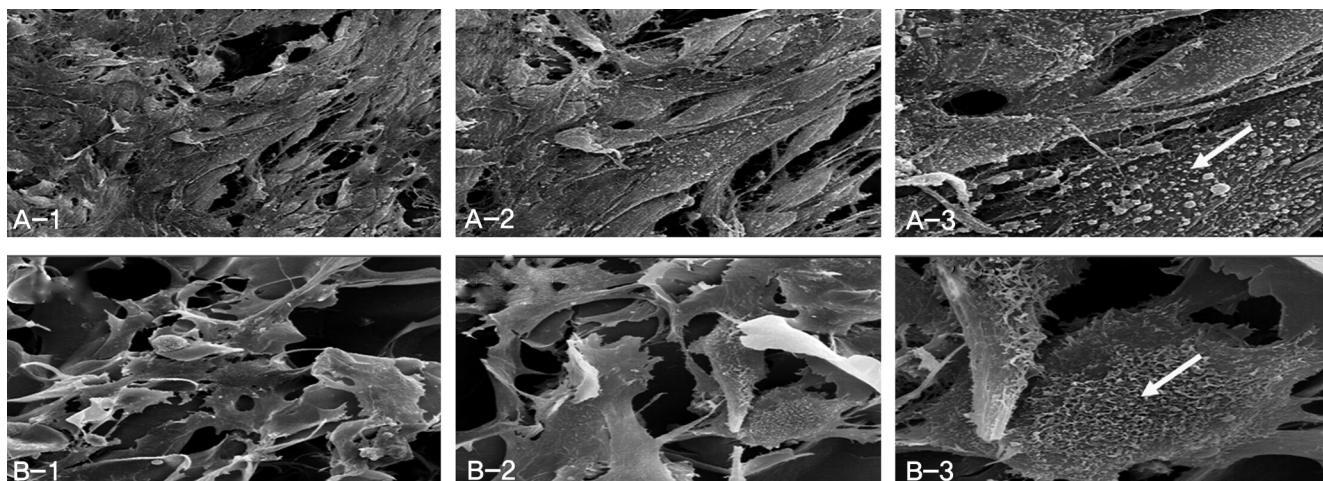


Fig. 4. Scanning electron microscopy of the surfaces of atelocollagen type I matrix for 1 week culture **(A)** and atelocollagen type II **(B)**. Note that the cells had newly synthesized extracellular matrix (single arrow).

Magnification is $\times 500$ (A-1, B-1), $\times 1,000$ (A-2, B-2), $\times 3,000$ (A-3, B-3).

발현이 관찰되었다. 이는 연골형 표현형을 가진 추간판 세포가 주위 지지체 환경이 제2형 교원질 성분일 때 원래의 기질 환경과 유사하여 향상된 기질 생산 반응을 보였을 것으로 추정한다.

한편 TGF- β 1과 BMP-2는 척추 추간판의 연골성 표현형을 촉진시킨다는 보고가 있었으며,^{5,17)} 단일의 성장 인자 cDNA를 사용하였을 때보다 두 가지 이상의 성장 인자 cDNA를 혼합된 각테일 용액을 사용하였을 때 추간판 세포의 당단백 생성량이 유의하게 높았으며 특히 TGF- β 1과 BMP-2 cDNA의 각테일 용액이 다른 성장인자 cDNA들의 조합보다 우수하다는 보고가 있었다.²²⁾ 이전의 여러 연구 결과에서는 TGF- β 가 BMP-2보다는 향상된 기질 생성 반응을 보이고 있다. 그럼에도 불구하고 TGF- β 는 잘못 주사되었을 때 생길 수 있는 합병증(경막 비후, 척수섬유화 등)의 우려와 정상적인 척추 추간판 퇴행에서 이미 많이 발현되는 점을 고려하면 BMP-2의 안정성과 연골성 기질 발현 능력을 볼 때 추간판 기질 재생에 있어 TGF- β 과 대등한 위치를 차지할 수 있다.^{5,22-25)} 이전의 결과들과 본 연구의 기질 생성 반응을 종합하면 TGF- β 1, BMP-2는 추간판 세포의 기질 재생을 자극하고 연골형 표현형을 발현 증가시킴을 알 수 있다. 특히 추간판 세포의 연골형 표현형 발현에 있어서 제 1형 보다는 제 2형 아테로콜라겐이 적합한 지지체임을 알 수 있다. 주사 전자 현미경을 통해 유전자 조작되고 7일간 배양된 추간판 세포의 형태를 관찰한 결과, 세포가 모든 지지체에 안정적으로 부착되어 있었으며, 기질이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 아테로콜라겐 지지체에서 추간판 세포가 어떤 독성의 영향 없이 생존 가능하다는 것을 의미한다. 따라서 조직 공학적 기법을 통해 아테로콜라겐 지지체에서 배양된 척추 추간판 세포는 Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2를 통한 유전자 전달로 효과적인 기질 생성 및 연골형 표현형을 발현하였다.

제 1형, 제 2형 아테로콜라겐, Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2를 사용한 어떠한 조합에서도 골형성 표지자인 osteocalcin mRNA는 발현되지 않았다. 이는 최종 분화된 추간판 수핵 세포는 BMP-2라는 강력한 골형성 자극 성장 인자라도 골형성을 하지 않는다는 이전의 결과와 같은 것이며^{5,25)} 이는 다시 한번 BMP-2를 골형성의 위험 없이 추간판 재생에 사용할 수 있음을 증명한 것이다.

본 연구에 있어서 제한점은 시험관 내 연구라는 점이며 이는 향후 유전자 조작된 추간판 세포를 아테로콜라겐 지지체에 배양하고 생체 이식, 나아가서는 추간판에 이식함으로써 생체내 효과를 증명해야 할 것이다.

결론

척추 추간판 세포는 제 1형, 2형 아테로콜라겐 지지체 내에서 생존 가능하였고, 제 1형, 제 2형 아테로콜라겐 지지체에서 아테로콜라겐을 이용한 TGF- β 1, BMP-2 cDNA 전달로 추간판 세포의 단백질 생성, 연골형 표현형의 발현 증가가 있었다. 이는 조직 공학, 세포 치료, 유전자 치료를 함께 적용하여 추간판 조직 재생을 시도한 것이며 추간판 질환 치료에 새로운 접근법을 제시하였다.

REFERENCES

1. Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:21-24.
2. Gibson JN, Waddell G. Surgical interventions for lumbar disc prolapse. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;2:CD001350.
3. David T. Long-term results of one-level lumbar arthroplasty: minimum 10-year follow-up of the CHARITE artificial disc in 106 patients. *Spine.* 2007;32:661-66.
4. Miyamoto K, Masuda K, Kim JG, et al. Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs. *Spine J.* 2006;6:692-703.
5. Kim DJ, Moon SH, Kim H, et al. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine.* 2003;28:2679-84.
6. Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J.* 2006;15:406-13.
7. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine.* 2005;30:2379-87.
8. Nishida K, Kang JD, Suh JK, Robbins PD, Evans CH, Gilbertson LG. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine.* 1998;23:2437-42.
9. Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, et al. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer: implications for the

- clinical management of intervertebral disc disorders. *Spine*. 2000;25:2573-79.
10. Chang G, Kim HJ, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, Kandel RA. Porous silk scaffolds can be used for tissue engineering annulus fibrosus. *Eur Spine J*. 2007;16:1848-57.
 11. Chen WH, Lo WC, Lee JJ, et al. Tissue-engineered intervertebral disc and chondrogenesis using human nucleus pulposus regulated through TGF-beta1 in platelet-rich plasma. *J Cell Physiol*. 2006;209:744-54.
 12. O'Halloran D M, Pandit AS. Tissue-Engineering Approach to Regenerating the Intervertebral Disc. *Tissue Eng*. 2007;13:1927-54.
 13. Wu D, Razzano P, Grande DA. Gene therapy and tissue engineering in repair of the musculoskeletal system. *J Cell Biochem*. 2003;88:467-81.
 14. Lipson SJ, Muir H. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine*. 1981;6:194-210.
 15. Lipson SJ, Muir H. Experimental intervertebral disc degeneration: morphologic and proteoglycan changes over time. *Arthritis Rheum*. 1981;24:12-21.
 16. Butler D, Trafimow JH, Andersson GB, McNeill TW, Huckman MS. Discs degenerate before facets. *Spine*. 1990;15:111-13.
 17. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine*. 1999;24:2419-25.
 18. Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al. An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc. *J Biomed Mater Res A*. 2003;64:248-56.
 19. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials*. 2006;27:335-45.
 20. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Atelocollagen for culture of human nucleus pulposus cells forming nucleus pulposus-like tissue in vitro: influence on the proliferation and proteoglycan production of HNPSV-1 cells. *Biomaterials*. 2006;27:346-53.
 21. Maldonado BA, Oegema TR Jr. Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J Orthop Res*. 1992;10:677-90.
 22. Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, et al. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail. *Spine*. 2008;33:1850-55.
 23. Wallach CJ, Kim JS, Sobajima S, et al. Safety assessment of intradiscal gene transfer: a pilot study. *Spine J*. 2006;6:107-12.
 24. Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction. *Spine J*. 2005;5:14-23.
 25. Kim H, Lee JU, Moon SH, et al. Zonal responsiveness of the human intervertebral disc to bone morphogenetic protein-2. *Spine*. 2009;34:1834-38.

아테로콜라겐 지지체, 유전자 치료, 배양된 수핵세포를 이용한 조직 공학적 추간판의 재생

김학선* • 이광일† • 김항*†, 권언혜* • 남미란*† • 장주웅† • 조인제* • 김보람* • 이환도* • 문성현*†

연세대학교 의과대학 정형외과학교실*, Korean Bone Bank (주)†, Brain Korea 21†

연구 계획: 토끼의 추간판 세포와 제5형 아데노바이러스(Ad) transforming growth factor beta-1(TGF- β 1), 아데노바이러스 bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), 아테로콜라겐을 이용한 실험적 연구

목적: 제1, 2형 아테로콜라겐과 성장 인자 유전자 치료의 토끼 추간판 세포의 기질 생성 반응을 알아보았다.

선행문헌의 요약: 아데노바이러스를 이용한 성장 인자 유전자 치료는 추간판 세포의 기질 재생에 효과적이다. 아테로콜라겐은 추간판 세포의 기질 합성에 유리한 환경을 제공한다. 하지만 아테로콜라겐 지지체에 유전자 치료를 병행하는 방법은 시도된 바가 없었다.

대상 및 방법: 토끼의 추간판 세포를 배양하였다. Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2 아테로콜라겐을 생산하였다. 추간판 세포를 Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2에 감염시키고 이 세포를 아테로콜라겐 지지체에 배양하였다. DNA생성은 [methyl- 3 H] Thymidine을 이용하였고 새로운 당단백 생성은 [35 S]Sulfur을 이용하였다. 또한 전사 수준에서의 추간판세포 관련 유전자의 변화를 확인하고자 RT-PCR을 통한 aggrecan, 제 1, 2형 교원질, osteocalcin mRNA발현을 조사하였다.

결과: 제1형 아테로콜라겐에 배양되고 Ad/TGF- β 1로 유전자 전달된 추간판 세포군은 대조군에 비해 130% 신생 당단백 생성증가가 있었고 제 2형 아테로콜라겐에 배양되고 Ad/TGF- β 1로 유전자 전달된 세포군은 180%의 신생 당단백 생성 증가가 있었다. ($p < 0.05$) 제 1형 아테로콜라겐에 배양되고 Ad/BMP-2로 유전자 전달된 추간판 세포군은 대조군에 비해 70% 신생 당단백 생성증가가 있었고 제2형 아테로콜라겐에 배양되고 Ad/BMP-2로 유전자 전달된 세포군은 95%의 신생 당단백 생성 증가가 있었다. ($p < 0.05$) 제 1, 2형 아테로콜라겐에 배양되고 Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2로 유전자 전달된 세포군은 제 1, 2형 교원질 mRNA발현증가가 있었으나 ($p < 0.05$) 어떠한 경우에도 osteocalcin mRNA발현은 없었다.

결론: 추간판 세포를 아테로콜라겐 지지체에서 배양하고, Ad/TGF- β 1, Ad/BMP-2으로 유전자 치료를 시행하여 효과적으로 연골형 기질을 생성을 유도할 수 있었다.

색인 단어: 추간판, 콜라겐, 지지체, TGF- β 1, BMP-2

약칭 제목: 조직 공학적 추간판의 재생