

Adenovirus에 의해서 발현된 BMP-2가 치주인대세포의 분화에 미치는 영향

김경화¹ · 박윤정² · 이상철¹ · 김태일¹ · 설양조¹ ·
이용무¹ · 구영¹ · 한수부¹ · 정종평¹ · 류인철¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실,

²서울대학교 치과대학 두개악안면 재건과학

I. 서론

치주질환으로 인한 치주조직의 상실은 치아손실의 중요한 원인이 되며 급성 또는 만성적인 골소실을 동반하게 되며 치주질환의 치료는 골소실의 방지 및 파괴된 골의 재생을 목적으로 한다. 이런 목적을 위하여 치태 및 치석제거술, 치근면활택술, 치주관막술 같은 기계적인 처치가 전통적으로 사용되어져 왔으며, 최근엔 조직유도재생술이나 자가골, 동종골 및 합성골 등을 치주조직의 재생에 사용하고 있다.¹⁻⁶⁾ 그러나 단순한 기계적인 방법의 경우 치주조직의 재생 없이 긴 접합 상피만으로 치유되며, 치주조직유도재생술의 방법은 2,3백 골결손부 등에 제한적인 효과만이 확인될 뿐 아직까지는 수평적 골소실을 포함한 보편적인 사용이 제한되고 있으며, 완전한 치주조직의 재생방법은 보고되지 않고 있다.⁷⁻¹⁰⁾

최근 파괴된 치주조직의 치료를 위하여 치주조직재생에 관여하는 세포들의 증식과 분화를 유도하는 것으로 알려진 PDGF-BB, IGF, TGF- β 등의 성장인자

등에 관한 연구도 활발히 시행되고 있으며¹¹⁻¹³⁾ 특히 그 중에서 골형성유도단백질(Bone Morphogenic Protein, BMP)의 골유도능력을 이용한 치주골 및 치주조직 재생에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁴⁻²⁰⁾ 골형성유도단백질은 TGF- β superfamily의 일종으로 연조직에 이식시 연골이나 골조직을 형성하는 작용을 하며 골아세포 뿐만 아니라 간엽세포를 분화시켜 신생골과 백악질의 형성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 세포배양실험에서 뿐만 아니라 개의 하악골에 형성된 골결손 치유과정에서 rhBMP -2가 악안면부위의 골재생에 폭넓은 치료효과를 가지고 있음이 보고되었으¹⁴⁾ Sigurdsson 등은¹⁷⁾ rhBMP를 이용해서 수평골 손실부의 골조직을 원래 높이까지 재생했을 뿐 아니라 백악질 같은 다른 치주접착조직의 재생에도 성공하였다고 보고하고 있다. 이외에도 BMP가 치조제용선 결손부의 증강이나 임플란트 주위의 치조골결손부, 선천적, 외상성 골결손 그리고 상악동하 골결손부위에 성공적으로 사용됨이 보고된 바 있다.²¹⁻²⁴⁾ 그러나 이러한 결과들에도 불구하고 임상적으로 적용

* 이 연구는 산자부 실버의료기기연구개발사업에서 지원받은 결과임.

교신저자 : 류인철, 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 110-768

E-mail : icrhyu@snu.ac.kr

하여 성공한 사례는 아직 보고되지 않았다.²⁵⁾ 일반적으로 단백질은 생체내에 들어가면 빠르게 분해되어, 지속적이고 안정적인 효과를 보여줄 수 없으며 현실적으로 사용하기에는 경제적 부담이 크다.^{26,27)} 이러한 단점을 극복하기 위하여 생체내에서 지속적이고 안정적으로 단백질이 존재할 수 있는 적절한 매개체의 개발이 필요하며, 현재 연구되어지고 있는 여러 방법들 중에서 ex vivo gene therapy에 기초한 유전자전달법이 한 대안이 될 수 있다.^{25,28,29)} ex vivo gene therapy는 환자에서 세포를 분리해 낸 후 원하는 단백질을 발현하는 플라스미드 벡터나 바이러스 벡터로 형질전환시켜 필요한 부위에 이식하여 사용할 수 있어 원하는 부위에 필요한 단백질을 공급할 수 있으며, 한번의 투여로 체내에서 일정한 기간만큼 원하는 단백질의 발현을 유도할 수 있고 유전자 전달 및 발현을 인위적으로 조절함으로써 치료제 작용의 선택성을 추구할 수 있다는 점에서 유용하며 비유합골절(nonunion fractures)이나 두개안면 결손부(craniofacial defects)의 치료 등의 정형외과 분야에서 다양하게 성공한 사례들이 보고되고 있다.³⁰⁻³²⁾

치주인대세포는 치근의 백악질과 치조골 사이에 존재하는 결합조직으로 치아를 지지할 뿐만 아니라 치아의 영양공급, 항상성, 파괴된 조직의 복구에 관여하는 것으로 알려져 있다.³³⁻³⁶⁾ 치주인대세포는 백악질 유래 세포나 골아세포로 분화할 수 있는 다양한 종의 세포들로 구성되어 있으며, 골아세포의 특성인 석회화 결절 형성이나 염기성 인산화 효소의 활성을 보이고, BMP-2, TGF- β , IGF 같은 골형성유도인자에 대해 반응을 하는 것으로 알려져 있다.^{34,36,37-41)} 이러한 연구결과들은 BMP-2가 치주인대세포를 골세포로의 분화를 유도하며 치주질환으로 인한 골조직 재생에 유용한 물질임을 시사한다. 본 연구에서는 치주질환으로 인해 파괴된 골조직 치료의 방법으로 치주인대세포의 ex vivo gene therapy의 가능성을 알아보기 위하여 치주인대세포에서 BMP-2가 과발현되도록 한 후 발현된 BMP-2가 치주인대세포의 골세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보고, 생체내 이식을 위하여 콜라겐지체에서 세포 배양시 치주인대세포의 BMP-2의

발현정도를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Recombinant adenovirus 제조

BMP-2 gene sequence를 PCR을 이용하여 증폭시킨 후 pShuttle vector에 삽입하였다. E.coli에서 재조합된 pShuttle vector를 증폭시킨 후 분리하여 Adeno-X viral DNA에 삽입하였다. 재조합된 viral DNA를 E.coli에서 증폭시킨 후 Lipofectamin(Invitrogen, USA)을 이용하여 HEK 293 cell에 감염시켜 BMP-2가 발현되는 virus를 제조하였다. 마찬가지로 repoter gene인 lacZ gene이 발현되는 virus를 제조하였다. 제조된 virus는 사용시까지 -80°C에 보관하였다.

2. 세포배양방법

W20-17 mouse normal cell line(ATCC, USA)은 BMP-2에 반응하여 염기성 인산화효소의 활성을 증가시킬 수 있는 세포로 재조합된 BMP-2 gene의 발현 및 활성을 관찰하기 위하여 사용하였다. 사람의 골육종세포주인 MG63 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, 골세포에서의 BMP-2의 안정적인 발현 및 활성을 평가하기 위하여 사용되었다. 치주인대세포는 서울대학교 병원 치과병원에 교정치료를 위하여 내원한 환자를 대상으로 제1소구치의 치근에서 채취하였다. 채취 직전에 큐렛을 사용하여 치석 및 치태 등을 제거하고, 생리식염수로 여러 번 세척하였다. 국소마취를 실시하고, 발거한 다음 치근의 중간 부위에 위치한 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음 60mm 세포배양접시에 고르게 분산시켜 1% antibiotic-antimycotic 용액(Invitrogen, USA) 및 10% FBS(Invitrogen, USA)가 첨가된 DMEM (Invitrogen, USA)을 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5 계대까지 배양하여 사용하였다. 배양

시 습도는 100%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 치주인대 세포는 재조합된 BMP-2의 발현, 활성 및 콜라겐지체에서의 세포형태를 관찰하는데 사용하였다.

3. 세포내 BMP-2 유전자 도입

각각의 세포를 필요한 크기의 cell culture plate에 접종한 다음 날 신선한 배지로 교환하였다. 세포당 2.5pfu의 BMP-2 gene virus와 Lac-Z gene virus를 각각의 well에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 동량의 배지를 첨가하고 필요한 시기까지 배양하였으며, 유전자를 도입시킨 당일을 0일로 삼았다. 세포를 배양하는 배지는 1% antibiotic-antimycotic 용액 및 10% FBS가 첨가된 DMEM을 사용하였고, 배양시 습도는 100%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다.

4. BMP-2 유전자의 발현 평가

배양된 W20-17 세포, MG63 세포, 치주인대세포를 12 well plate에 well 당 1×10^5 세포를 접종하고 다음날 BMP-2 유전자를 세포내로 도입시켰다. 유전자를 도입시킨 다음날 배지를 모아서 사용시까지 -20℃에서 보관하였다. 유전자가 도입되지 않은 세포의 배지를 모아서 대조군으로 사용하였다. 세포를 배양하는 배지는 1% antibioticantimycotic 용액 및 10% FBS가 첨가된 DMEM을 사용하였고, 배양시 습도는 100%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 모아둔 배지에서 BMP-2 Immunoassay kit (R&D systems, USA)를 이용하여 BMP-2 gene의 발현정도를 확인하였다.

5. 발현된 BMP-2 gene의 활성 평가

배양된 W20-17세포를 12well plate에 well 당

1×10^5 세포를 접종하고 다음날 BMP-2 유전자를 세포내로 도입시켰다. 유전자가 도입된 다음날 배지를 모아서 사용시까지 -20℃에서 보관하였다. 유전자가 도입되지 않은 세포의 배지를 모아서 대조군으로 사용하였다. 세포를 배양하는 배지는 1% antibiotic-antimycotic 용액 및 10% FBS가 첨가된 DMEM을 사용하였고, 배양시 습도는 100%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 발현된 BMP-2 gene의 활성을 평가하기 위하여 12 well plate에 well 당 W20-17 세포, 인간의 골육종세포주인 MG63 세포 및 치주인대세포를 각각 1×10^5 수로 접종하고 다음날 앞에서 제조된 conditioned media를 첨가하여 3일 동안 배양한 후 염기성 인산화 효소의 활성을 측정하였다. 염기성 인산화 효소의 활성을 측정하기 위하여 배양액을 제거하고 세포를 HBSS(Invitrogen, USA)로 한 번 세척 후 Trypsin-EDTA(Invitrogen, USA)로 세포를 떼어서 원심분리하여 세포를 모았다. 모아진 세포를 초음파 파쇄 후 원심분리하여 상층액을 모은 후 0.1 M glycine(Sigma USA), 0.1% Triton X-100(Sigma, USA), 0.15M p-nitrophenylphosphate(Sigma, USA)의 반응액을 첨가하여 30분 동안 37℃에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.1N NaOH 용액을 첨가하여 반응을 멈추고 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 염기성 인산화 효소의 활성은 분해된 p-nitrophenol의 양으로 나타내었다. 염기성 인산화 효소 활성을 측정하고 남은 상층액을 이용하여 세포의 총단백질량을 Proteinassay kit (Bio-Rad, USA)를 이용해서 측정하였다.

6. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포에서 과발현된 BMP-2가 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향

1) 세포활성도 측정

치주인대세포에서 발현된 BMP-2 유전자가 세포의 증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT (methyl thiazol-2-YL-2,5-diphenyl tetrazo-

lim bromide, Sigma, USA) 시험을 시행하였다. 5세대 배양된 치주인대세포를 96well plate에 well 당 5×10^5 수로 접종하고 다음날 BMP-2 유전자와 Lac-Z 유전자를 세포내로 도입시켰으며 이를 실험군으로, 유전자를 도입시키지 않은 군을 대조군으로 사용하였다. 유전자가 도입된 후 각각 1일, 7일 동안 배양한 후 MTT 용액 $50 \mu\text{l}$ 를 각 well에 첨가하고 37°C 에서 배양하였다. 4시간 후 MTT 용액을 제거하고 formazon 결정을 용해시키기 위해 DMSO를 각 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 결정을 녹이기 위해 plate를 잘 흔든 후 Microplate Reader(Thermo Max, Molecular Devices, USA)로 540nm 에서 흡광도를 측정하였다. 세포를 배양한 배지는 1% antibiotic-antimycotic 용액, 10% FBS이 첨가된 DMEM을 사용하였고, 배양시 습도는 100%, 온도는 37°C 로 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2 를 계속 공급하였다.

2) 염기성 인산화 효소 활성 평가

치주인대세포에서 과발현된 BMP-2가 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 염기성 인산화 효소의 활성을 측정하였다. 5세대 배양된 치주인대세포를 12 well plate에 well 당 치주인대세포를 각각 1×10^5 수로 접종하고 다음날 BMP-2 유전자와 Lac-Z 유전자를 세포내로 도입시켰으며 이를 실험군으로, 유전자를 도입시키지 않은 군을 대조군으로 사용하였다. 유전자가 도입된 후 1, 7일 동안 배양한 후 앞에서의 방법으로 염기성 인산화 효소의 활성을 측정하였다. 세포를 배양한 배지는 1% antibiotic-antimycotic 용액, 10% FBS이 첨가된 DMEM (Invitrogen, USA)을 사용하였고, 배양시 습도는 100%, 온도는 37°C 를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2 를 계속 공급하였다.

3) 석회화결절 형성 관찰

치주인대세포에서 발현된 BMP-2 gene이 세포의 결절 형성에 대한 영향을 알아보기 위하여 치주인대세포를 24 well plate에 well 당 각각 1×10^4

수로 접종하고 다음날 BMP-2 유전자와 Lac-Z 유전자를 세포내로 도입시켰으며 이를 실험군으로, 유전자를 도입시키지 않은 군을 대조군으로 사용하였다. 형질도입된 후 14일 후 세포를 95% 에탄올에서 15분 동안 고정한 후 증류수로 두 번 세척한 후 Ali-zarin Red S 용액(pH4.3)을 각 well에 첨가하고 5분 동안 방치하였다. 다시 증류수로 세척한 후 석회화결절을 관찰하였다. 세포를 배양한 배지는 1% antibiotic-antimycotic 용액, 10% FBS, 10mM sodium β -glycerolphosphate(Sigma, USA), $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid(Sigma, USA), 50nM dexamethasone(Sigma, USA)이 첨가된 DM-EM을 사용하였고, 배양시 습도는 100%, 온도는 37°C 를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2 를 계속 공급하였다.

7. 콜라겐지지체에서 BMP-2 gene 발현 평가 및 세포 형태 관찰

콜라겐지지체(Calcitek, Germany)에 유전자 조작된 세포를 부착시켜 BMP-2 유전자의 발현여부를 확인하였다. 콜라겐지지체를 0.5×0.5 의 크기로 자른 후 지지체당 1×10^5 의 치주인대세포를 접종하였다. 접종 다음날 세포 당 2.5pfu의 BMP-2 유전자 또는 Lac-Z 유전자를 세포로 도입시켰다. 4시간 후에 신선한 배지를 첨가하고 7일 동안 배양하였다. BMP-2 유전자의 발현을 평가하기 위하여 7일 후 배지를 모아서 배지에서 BMP-2 Immunoassay kit를 이용하여 BMP-2의 발현정도를 확인하였다. Lac-Z의 발현여부를 확인하기 위하여 β -galactosidase staining kit(Sigma, USA)를 이용하여 콜라겐지지체에 부착된 세포를 염색하였다.

세포모양 관찰을 위하여 7일 후 세포가 이식된 콜라겐지지체를 2.5% glutaraldehyde 및 OsO_4 로 고정시킨 후 통법에 따라 탈수를 시행하고 gold particle 로 코팅 후 주사전자현미경(Jeol, Japan)으로 세포모양을 관찰하였다.

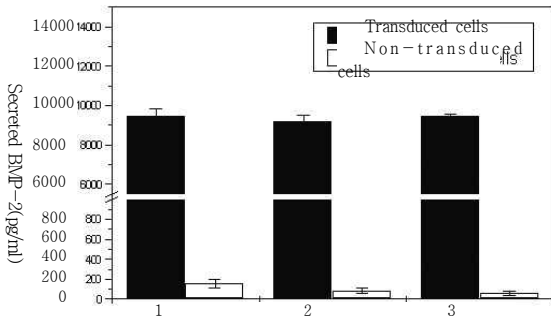


Figure 1. BMP-2 gene의 발현. lane 1:W20-17 세포, lane 2:치주인대세포, lane 3: MG63 세포, * 각각의 세포의 대조군에 비해 유의하게 높음 ($p<0.01$)

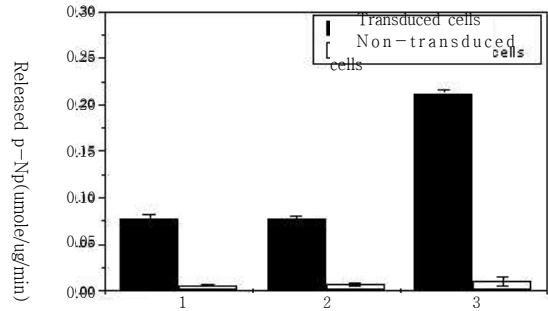


Figure 2. Conditioned media로 처리 후 염기성 인산화 효소의 활성. lane 1:W20-17 세포, lane 2:치주인대세포, lane 3:MG63 세포, * 각각의 세포의 대조군에 비해 유의하게 높음 ($p<0.05$), # 다른 세포들에 비해서 유의하게 높음 ($p<0.05$)

8. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 사후 검정에 Duncan 법을 시행하였다.

III. 결과

1. BMP-2 gene 발현 평가

세포내로 도입된 BMP-2 gene의 안정적인 발현을 확인하기 위하여 W20-17, 치주인대세포, MG63 세포에 BMP-2 유전자를 도입시킨 후 immuno-assay kit를 사용하여 BMP-2의 발현량을 관찰하였다. 연구결과 BMP-2 유전자가 도입된 각각의 모든 세포들은 대조군에 비해 BMP-2가 유의하게 높게 발현되었다(Figure 1).

2. 발현된 BMP-2 gene의 활성 평가

형질도입된 세포에서 발현된 BMP-2의 활성을 알아보기 위하여 conditioned media로 W20-17 세포, 치주인대세포 및 MG63 세포를 배양한 후 세포의 염기성 인산화 효소의 활성을 측정하였다.

BMP-2가 발현된 conditioned media에서 배양된 W20-17 세포, 치주인대세포, MG63 세포 모두에서 대조군에서 만들어진 conditioned media에서 배양된 것 보다 유의하게 높은 염기성 인산화 효소의 활성을 보여주었다(Figure 2).

3. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포에서 과발현된 BMP-2가 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향

1) 세포활성도 측정

치주인대세포에서 발현된 BMP-2 gene이 세포의 증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT (methyl thiazol-2-YL-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA) 시험을 시행하였다. 형질도입 후 1일째에 흡광도를 측정한 결과 BMP-2 유전자가 도입된 군, Lac-Z 유전자가 도입된 군, 대조군 모두 비슷한 흡광도를 보였으며, 7일에서도 세 군 모두 비슷한 흡광도를 보였다. 또한 각 군내에서 세 군 모두 1일과 7일 간의 흡광도는 통계적으로 유의성있는 차이를 보이면서 1일 보다 7일 째에 흡광도가 증가되는 양상을 보여주었다(Figure 3).

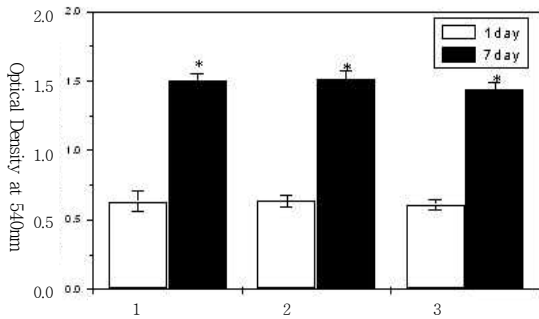


Figure 3. BMP-2 유전자 도입된 치주인대세포의 세포활성도. lane 1:W20-17 세포, lane 2:치주인대세포, lane 3:MG63 세포, * 1일에 비해 유의하게 증가됨 ($p<0.05$)

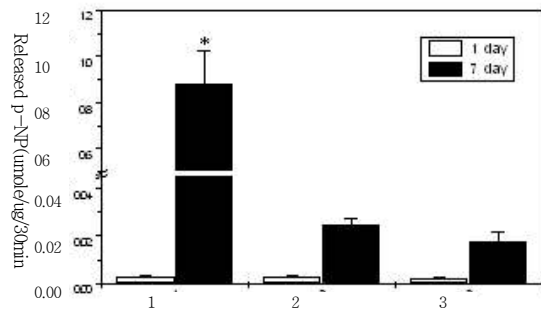


Figure 4. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포의 염기성 인산화 효소활성. lane 1:BMP-2 유전자 도입군, lane 2:Lac-Z 유전자 도입군, lane 3:대조군, * 1일에 비해 유의하게 증가함 ($p<0.05$)

2) 염기성 인산화 효소 활성 평가

치주인대세포에서 과발현된 BMP-2가 세포의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 염기성 인산화 효소의 활성을 1일, 7일 후에 측정하였다. 1일에는 BMP-2 유전자가 도입된 군, Lac-Z 유전자가 도입된 군, 대조군 모두 비슷한 활성을 보여주었으나 7일째에는 BMP-2 유전자가 도입된 군이 다른 두 군에 비해 효소활성도가 유의하게 높게 나타났으며, Lac-Z 유전자가 도입된 군과 대조군 간의 효소활성도는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 또한 각 군내 비교에서 세 군 모두 1일에 비해 7일에 효소활성도가 유의하게 증가하였다(Figure 4).

3) 석회화결절의 관찰

치주인대세포에서 과발현된 BMP-2가 세포의 결절 형성에 대한 영향을 알아보기 위하여 형질도입 후 14일 동안 배양한 후 alizarin red S로 염색하여 결절형성의 정도를 관찰한 결과 BMP-2 유전자가 도입된 군에서 제일 높은 석회화 결절 형성을 보여주었으며, Lac-Z 유전자가 도입된 군과 대조군은 비슷한 양상의 석회화 결절 형성을 보여주었으며, BMP-2 유전자가 도입된 군에 비해 매우 낮게 나타났다(Figure 5).



Figure 5. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포의 석회화 결절 형성. lane 1:BMP-2 유전자 도입군, lane 2:Lac-Z 유전자 도입군, lane 3:대조군

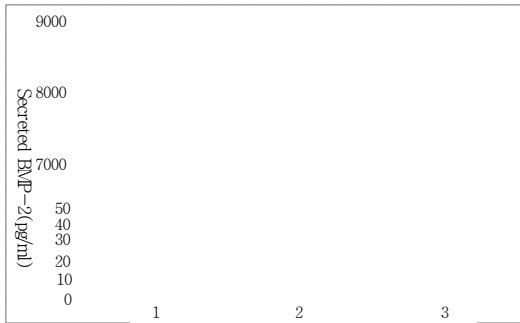


Figure 6. 콜라겐지지체에 부착된 치주인대세포에서의 BMP-2 gene의 발현. lane 1:BMP-2 유전자 도입군, lane 2:Lac-Z 유전자 도입군, lane 3:대조군, * BMP-2 유전자의 발현이 대조군에 비해 유의하게 높게 발현됨 ($p<0.05$)

4. 콜라겐지지체에 부착된 치주인대세포에서의 BMP-2 유전자 발현 평가

유전자가 조작된 세포를 체내로 이식하기 위한 지지체로 콜라겐으로 만들어진 Collatape를 선택하였다. 지지체에 부착된 유전자조작세포에서 단백질의 발현을 확인하기 위하여 Collatape에 이식된 치주인대세포에서의 BMP-2의 발현을 확인하였다. Collatape에 부착된 치주인대세포에 BMP-2 유전자 도입시 대조군에 비해 유의하게 높게 발현되었다. 또한 Lac-Z 유전자가 도입된 군에서는 대조군과 거의 비

슷한 양의 BMP-2의 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 6).

5. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포의 콜라겐지지체에서의 주사전자현미경적 관찰

인위적으로 과발현되도록 조작된 단백질이 지지체에 부착된 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Collatape에 이식된 치주인대세포에 BMP-2 유전자를 세포 내로 도입시킨 후 세포의 형태 변화를 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. BMP-2 유전자가 도입된 군이나 도입되지 않은 군 둘 다 비슷한 양상으로 세포의 본래 형태를 유지하면서 콜라겐지지체에 잘 부착된 것을 확인할 수 있었다(Figure 7).

또한 생체 내에 이식 시 이식된 세포의 확인을 위하여 제작된 Lac-Z 유전자의 활성을 확인하기 위하여 Collatape에 치주인대세포를 이식하고, Lac-Z 유전자를 도입시킨 후 β -galactosidase의 발현여부를 염색하여 확인하였다. 일반 plate에서 배양된 치주인대세포나 Collatape에 부착된 치주인대세포 모두에서 β -galactosidase의 발현을 관찰할 수 있었다(Figure 8).

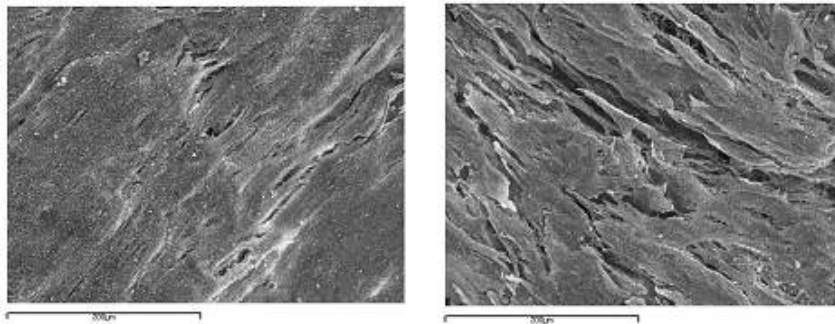


Figure 7. 콜라겐 지지체에 부착된 BMP-2 유전자도입치주인대세포의 주사전자현미경적 관찰 (A) BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포, (B) 대조군, 300X

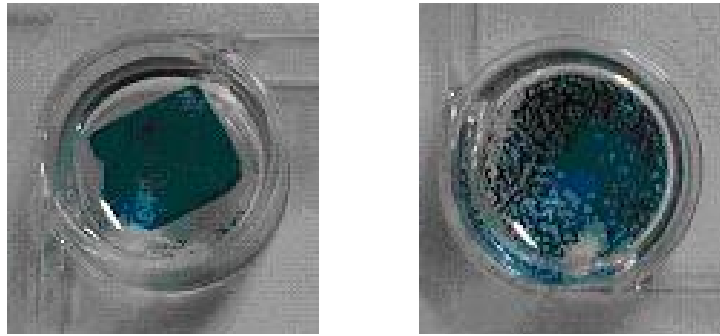


Figure 8. 콜라겐 지지체에 부착된 BMP-2 유전자도입치주인대세포의 주사전자현미경적 관찰 (A) BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포, (B) 대조군, 300X

IV. 총괄 및 고찰

이 연구는 치주조직재생에서 중요한 역할을 하는 치주인대세포를 BMP-2가 과발현되도록 유전자 조작한 후 BMP-2의 발현 여부 및 활성, 생체내 이식에 필요한 콜라겐지지체에 부착된 치주인대세포에서 BMP-2의 발현여부를 확인하였다. 본 연구에서 제작된 BMP-2 gene virus는 mouse normal cell line인 W20-17 세포에서 정상적으로 발현됨을 확인할 수 있었다. 발현된 단백질이 정상적으로 작용하는 지를 확인하기 위하여 발현된 BMP-2가 함유된 conditioned media에서 W20-17 세포, 치주인대세포, MG63 세포를 배양하여 염기성 인산화효소의 활성을 관찰한 결과 발현된 BMP-2가 정상적으로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다. 유전자전달체로 사용될 치주인대세포를 유전자 조작시 BMP-2가 치주인대세포에서 안정적으로 발현되는지 확인하기 위하여 제작된 BMP-2 gene virus로 치주인대세포를 처리한 결과 BMP-2가 발현됨을 확인할 수 있었다. 발현된 BMP-2가 치주인대세포의 분화에 미치는 영향을 관찰한 결과 염기성 인산화 효소의 활성 및 석회화 결절형성이 BMP-2 유전자가 도입되지 않은 군에 비해 유의하게 높게 나왔다. 또한 치주인대세포를 생체내에 이식하기 위하여 선택된 Collatape에서 BMP-2가 정상적으로 발현이 되는지 여부와 처리된 virus에 의하여 지지체에서의 세

포의 형태 변화를 관찰하기 위하여 Immunoassay와 주사전자현미경을 사용하였다. 지지체에 부착된 치주인대세포에서 BMP-2의 안정적인 발현을 확인할 수 있었으며 주사전자현미경적 관찰에서도 형질도입된 군이나 대조군 모두 비슷한 양상의 세포형태를 보여주고 있었으며, 콜라겐지지체에 잘 부착되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 repoter 유전자인 Lac-Z 유전자가 도입된 군에서 plate에서 배양된 치주인대세포나 collatape에 부착된 치주인대세포 모두에서 β -galactosidase의 발현을 확인할 수 있었으며, Lac-Z 유전자가 도입되지 않은 군에서는 β -galactosidase가 발현되지 않았다(data not shown).

치주질환으로 인하여 손상된 치주조직의 재생에서 치주인대세포는 필수적이다. 다양한 종의 세포들로 이루어진 치주인대세포는 치근의 백악질과 치조골사이 에 위치하면서 백악질 유래세포나 골아세포로 분화할 수 있다고 보고되어지고 있다. Seo 등의⁴²⁾ 연구에서 보면 치주인대세포에서 줄기세포의 표지인 STRO-1, CD146 등을 관찰할 수 있었으며, cementoblast-like cells, adipocytes, collagen forming cell들로 분화됨을 확인하였다. BMP는 다양한 기관의 발달에 관여할 뿐 아니라 골격의 발달 과정에서 중요한 역할을 하며,⁴³⁾ 자세한 기전은 밝혀지지 않고 있지만 성체에서 이소성 또는 동소성의 골형성을 유도하는 것으로 보고되었다.^{44,45)}

BMP에 의한 이소성 및 동소성 골형성은 BMP에 반응하는 만능줄기세포(pluripotent stem cells)나 progenitor 세포 등으로 구성된 성체의 조직들이 연골이나 골형성에 과정에 관여한다고 볼 수 있다⁴⁶⁻⁴⁸. 아직까지 BMP에 반응하는 모든 조직들이 밝혀지지 않았지만, 초기 연구에서 BMP에 반응하는 배양할 수 있는 세포들로는 성체의 피부세포, 근육세포, 치은세포, 골세포 등으로 알려져 있다⁴⁷⁻⁴⁹. 치과 영역에서도 BMP의 치조골 재생에 있어서의 역할에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 치조제 융선 결손부의 증강이나 임플란트 주위의 치조골 결손부, 선천적, 외상성 골결손, 그리고 상악동하 골결손부위에서 성공인 사용이 보고된 바 있다¹⁹⁻²¹. 그러나 이러한 인자들은 생체내 적용시 빠른 분해 때문에 적당한 전달체가 필요하며 전달체의 대안으로써 유전자전달방법을 생각할 수 있다. 유전자전달법은 필요한 부위에 이식하여 사용할 수 있어 원하는 부위에 필요한 단백질을 공급할 수 있으며, 한 번의 투여로 체내에서 일정한 기간만큼 원하는 단백질의 발현을 유도할 수 있다. 유전자 전달법에 의한 치료에 있어 세포의 선택은 매우 중요한 부분이다. 본 연구에서 사용되어질 세포들은 골형성이나 골세포의 기능을 담당할 수 있고 조직에서의 분리가 용이하고 배양이 잘 되는 세포이어야 한다. 또한 도입될 유전자에 쉽게 반응을 하여 원하는 조직으로의 분화가 원활하게 이루어져야 하며, 도입된 유전자에 의해 발현될 단백질의 분비가 원활하게 될 수 있어야 한다⁵⁰⁻⁵¹. 본 연구에서는 치주조직 재생에서 중요한 역할을 담당하는 치주인대세포에 BMP-2가 과발현 되도록 유전자 조작 후 치주조직부위에 지속적인 BMP-2를 공급할 수 있는 지 여부와 치주인대세포 자체가 발현된 BMP-2의 자극으로 골아세포로 용이하게 분화되어 세포 자체가 골의 구성원이 될 가능성을 알아보기 위하여 연구를 시행하였다.

연구결과 치주인대세포의 BMP-2 gene의 전달체로서의 사용가능성과 유전자 조작된 치주인대세포의 전달체로서 콜라겐 지지체의 사용가능성을 확인할 수 있었다. 이 연구결과 들을 바탕으로 앞으로의

연구에서 실질적으로 BMP-2가 과발현되는 치주인대세포를 생체 내에 이식하여 치주조직재생에 미치는 영향을 확인할 필요가 있으며, 과발현된 BMP-2가 치주인대세포에 작용하는 기전 및 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

1. 본 연구에서 제작된 BMP-2 유전자 virus 는 안정적으로 BMP-2를 발현시켰으며, W20-17세포, MG63 세포, 치주인대세포들에서 골세포로의 분화를 나타내는 ALPase 활성을 증가시켰다.
2. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포는 안정적으로 BMP-2를 발현시켰으며, 자기자신에게서 발현되는 BMP-2에 의해서 ALPase의 활성이 증가되었다.
3. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포는 자기자신에게서 발현되는 BMP-2에 의하여 세포증식을 방해 받지 않았으며, 석회화결절을 형성시켰다.
4. BMP-2 유전자가 도입된 치주인대세포는 콜라겐 지지체에 이식되어서도 안정적으로 BMP-2를 발현시켰으며, 콜라겐지지체에 잘 부착되어 있음을 확인하였다.

VI. 참고문헌

1. Moskow BS, Karsh F, Stein SD. Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. J Periodontol. 1979 Jun;50(6):291-300.
2. Bulstra s Experiences in human delayed non-unions using OP-1(BMP-7). Proceedings, First European Conference on Bone Morphogenic Proteins. Abstract 62
3. Carraro JJ, Sznajder N, Alonso CA. Intraoral cancellous bone autografts in the treatment of infrabony pockets. J

- Clin Periodontol. 1976 May;3(2):104-9.
4. Garraway R, Young WG, Daley T, Harbrow D, Bartold PM. An assessment of the osteoinductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model. *J Periodontol.* 1998 Dec;69(12): 1325-36.
 5. Zybutz MD, Laurell L, Rapoport DA, Persson GR. Treatment of intrabony defects with resorbable materials, non-resorbable materials and flap debridement. *J Clin Periodontol.* 2000 Mar;27(3):169-78.
 6. Takata T. Oral wound healing concepts in periodontology. *Curr Opin Periodontol.* 1994;119-27.
 7. Becker W, Becker BE. Treatment of mandibular 3-wall intrabony defects by flap debridement and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. Long-term evaluation of 32 treated patients. *J Periodontol.* 1993;64:1138-44 .
 8. Warrer K, Caton JG, Reid T. A prospective multicenter study evaluating periodontal regeneration for Class II furcation invasions and intrabony defects after treatment with a bioabsorbable barrier membrane: 1-year results. *J Periodontol.* 1996;67:641-9.
 9. Becker W, Lynch SE, Lekholm U et al. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol.* 1992;63:929-40.
 10. Eickholz P, Kim TS, Steinbrenner H et al., Tissue regeneration with bioabsorbable barriers: intrabony defects and class II furcations. *J Periodontol.* 2000; 71:999-1008.
 11. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol.* 1993 Feb;64(2):142-8.
 12. Piche JE, Graves DT. Study of the growth factor requirements of human bone derived cells: a comparison with human fibroblasts. *Bone.* 1989;10(2): 131-8.
 13. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG. Differential effect of TGF-beta 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 1994 Jul;65(7):641-8.
 14. Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol.* 1995;66: 506-10.
 15. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 1999;19:40-58.
 16. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res.* 1997;76: 1460-70.
 17. Kuboki Y, Sasaki M, Saito A, Takita H, Kato H. Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106:197-203.
 18. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineer-

- ing, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8:154-63.
19. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol*. 1999;70:1026-31.
 20. 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;78:1624-33.
 21. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K et al., Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*. 1995;66:131-8.
 22. Barboza EP, Duarte Sorensen RG, Riedel GE, Ridge augmentation following implantation of recombinant human morphogenetic protein-2 in *Periodontol*. 2000 ;71:488-96.
 23. Howell TH, Fiorellini J, Jones A et al., A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997;17:124-39
 24. Terheyden H, Jepsen S, Moller B, Tucker MM, Rueger DC. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants using a combination of deproteinized bone xenografts and recombinant human osteogenic protein-1. A histometric study in miniature pigs. *Clin Oral Implants Res*. 1999;10:510-21
 25. Winn SR, Hu Y, Sfeir C, Hollinger JO. Gene therapy approaches for modulating bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Aug 20;42(1-2):121-38.
 26. Crombleholme TM. Adenoviral-mediated gene transfer in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2000 Nov-Dec;8(6):460-72.
 27. Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7. *J Cell Biochem*. 2000 Jun 6;78(3):476-86.
 28. Baum BJ, Kok M, Tran SD, Yamano S. The impact of gene therapy on dentistry: a revisiting after six years. *J Am Dent Assoc*. 2002 Jan;133(1):35-44.
 29. Anusaksathien O, Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002 Jun;3(2):129-39.
 30. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S et al., The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am*. 1999 Jul;81(7):905-17.
 31. Krebsbach PH, Gu K, Franceschi RT, Rutherford RB. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum Gene Ther*. 2000 May 20;11(8):1201-10.
 32. Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD et al., Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of

- the BMP-2 gene. *Gene Ther.* 2000 May; 7(9):734-9.
33. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000. 2000 Oct;24:253-69.
 34. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I et al., Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res.* 2002;43 (2-3):257-64.
 35. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H et al., Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003 Apr 1;60(5):491-502.
 36. Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res.* 2001 Apr;36(2):71-9.
 37. Ouyang H, McCauley LK, Berry JE et al., Response of immortalized murine cementoblasts/periodontal ligament cells to parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in vitro. *Arch Oral Biol.* 2000 Apr;45(4):293-303.
 38. Ohno S, Doi T, Fujimoto K et al., RGD-CAP (betaig-h3) exerts a negative regulatory function on mineralization in the human periodontal ligament. *J Dent Res.* 2002;81(12):822-5.
 39. Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res.* 2003 Jun;82(6):454-9.
 40. Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE, Vrotsos IA. Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontol.* 2003 Jul;5(3):63-70.
 41. Zhao M, Berry JE, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein-2 inhibits differentiation and mineralization of cementoblasts in vitro. *J Dent Res.* 2003 Jan;82 (1):23-7.
 42. Seo BM, Miura M, Gronthos S et al., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.
 43. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev.* 1996 Aug;6(4):432-8.
 44. Reddi AH. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1992 Oct;4(5):850-5.
 45. Kingsley DM. What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet.* 1994 Jan; 10(1):16-21.
 46. Duprez DM, Coltey M, Amthor H, Brickell PM, Tickle C. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev Biol.* 1996 Mar 15;174(2):448-52.
 47. Kawasaki K, Aihara M, Honmo J et al., Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin. *Bone.* 1998 Sep;23(3):223-31.
 48. Takiguchi T, Kobayashi M, Suzuki R et al., Recombinant human bone morphoge-

- netic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. *J Periodontal Res.* 1998 Nov;33(8):476-85.
49. Cheifetz S, Li IW, McCulloch CA, Sampath K, Sodek J. Influence of osteogenic protein-1(OP-1;BMP-7) and transforming growth factor-beta 1 on bone formation in vitro. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1-4):71-8.
 50. Ye X, Rivera VM, Zoltick P, Cerasoli F Jr, et al., Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science.* 1999 Jan 1; 283(5398):88-91.
 51. Krebsbach PH, Gu K, Franceschi RT, Rutherford RB. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum Gene Ther.* 2000 May 20;11(8):1201-10.

Osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP-2 on Human Periodontal Ligament cells

Kyoung-Hwa Kim¹ · Yoon-Jeong Park² · Sang-Cheul Lee¹ · Tae-il Kim¹ · Yang-Jo Seol¹
Yong-Moo Lee¹ · Young Ku¹ · Soo-Boo Han¹ · Chong-Pyoung Chung¹ · In-Chul Rhyu¹

¹Department of Periodontology, School of Dentistry, Seoul National University

²Department of Craniomaxillofacial Reconstructive Science,
School of Dentistry, Seoul National University

The regeneration of lost periodontal tissue is a major goal of therapy. Periodontal ligament cell(PDL) is a specialized connective tissue that connects cementum and alveolar bone to maintain and support teeth in situ and preserve tissue homoeostasis. Bone morphogenetic proteins(BMPs) have shown much potential in the reconstruction of the periodontum by stimulate new bone and new cementum formation. Limitiations of BMP administration to periodontal lesions is high dose delivery, BMP transient biological activity, and low bioavailability of factors at the wound site. Gene delivery method can be alternative treatment strategy to deliver BMPs to periodontal tissue. The purpose of this study is to investigate efficiency of BMP-2 gene delivery with cell-based therapy using PDL cells.

PDL cell were transduced with adenoviruses encoding either BMP-2 or Lac-Z gene. To evaluate osteogenic activity of expressed BMP-2 on PDL cells, we investigated secreted BMP-2, cellular activity, ALPase, produced mineralized nodules. To evaluate collagen scaffold as carrier for transduced cell delivery, we examined morphology and secreted BMP-2 of transduced PDL cells on it.

BMP-2 transduced PDL cells produced higher levels of BMP-2, ALPase, mineralized nodules than non transduced cells. Cellular activity of transduced cells was showed similar activity to non transduced cells. Transduce cells attached on collagen scaffold secreted BMP-2 at 7day and was showed similar morphology to non transduced cells.

These results demonstrated that transduced PDL cells produced biologically active BMP-2 and collagen scaffold could be carrier of transduced cells.

Key words : BMP-2, Adenovirus, PDL cell, gene delivery, collagen scaffold