

미성숙 매복지치의 치낭, 치수, 치근유두 조직에서 다능성 줄기세포의 분리와 특성화에 대한 연구

송정호¹ · 박봉욱² · 변준호² · 강은주³ · 노규진³ · 신상훈¹ · 김옥규¹ · 김종렬¹

¹부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실,

경상대학교 ²치의학전문대학원 치과학교실 구강악안면외과, 건강과학연구원, ³수의과대학 수의산과학

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:186-96)

Isolation and characterization of human dental tissue-derived stem cells in the impacted wisdom teeth: comparison of dental follicle, dental pulp, and root apical papilla-derived cells

Jung-Ho Song¹, Bong-Wook Park², June-Ho Byun², Eun-Ju Kang³,
Gyu-Jin Rho³, Sang-Hun Shin¹, Uk-Kyu Kim¹, Jong-Ryoul Kim¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea

²Department Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine and Institute of Health Science, ³College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

Introduction: The first aim of this study was to isolate the dental tissue-derived stem cells from the dental follicle (DF), dental pulp (DP), and root apical papilla (RAP) of the extracted wisdom teeth. Second was to evaluate their characterization with the expressions of transcription factors and cell surface markers. Finally, their ability of the *in vitro* multi-lineage differentiations into osteogenic and adipogenic cells were compared, respectively.

Materials and Methods: Dental tissues, including dental follicle, dental pulp, and root apical papilla, were separated in the extracted wisdom teeth. These three dental tissues were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with supplements, respectively. After passage 3, the homogeneous shaped dental tissue-derived cells were analyzed the expression of transcription factors (Oct-4, Nanog and Sox-2) and cell surface markers (CD44, CD90 and CD105) with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. In order to evaluate *in vitro* multi-lineage differentiations, the culture media were changed to the osteogenic and adipogenic induction mediums when the dental tissue-derived cells reached to passage 3. The characteristics of these three dental tissue-derived cells were compared with immunohistochemistry.

Results: During primary culture, heterogenous and colony formatted dental tissue-derived cells were observed in the culture plates. After passage 2 or 3, homogenous spindle-like cells were observed in all culture plates. Transcription factors and mesenchymal stem cell markers were positively observed in all three types of dental tissue-derived cells. However, the quantity of expressed transcription factors was most large in RAP-derived cells. In all three types of dental tissue-derived cells, osteogenic and adipogenic differentiations were observed after treatment of specific induction media. *In vitro* adipogenic differentiation was similar among these three types of cells. *In vitro* osteogenic differentiation was most strongly and frequently observed in the RAP-derived cells, whereas rarely osteogenic differentiation was observed in the DP-derived cells.

Conclusion: These findings suggest that three types of human dental tissue-derived cells from extracted wisdom teeth were multipotent mesenchymal stem cells, have the properties of multi-lineage differentiations. Especially, stem cells from root apical papilla (SCAP) have much advantage in osteogenic differentiation, whereas dental follicle cells (DFCs) have a characteristic of easy adipogenic differentiation.

Key words: Human dental tissue-derived stem cells, Dental pulp stem cells (DPSCs), Dental follicle cells (DFCs), Stem cells from root apical papilla (SCAP), Mesenchymal stem cells (MSCs)

(원고접수일 2010.4.5 / 1차수정일 2010.4.30 / 2차수정일 2010.5.7 / 게재확정일 2010.5.20)

I. 서 론

김종렬

626-770 경상남도 양산시 물금읍 범어리

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Jong-Ryoul Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,
Pusan National University

Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan, Gyeongsangnam, 626-770, Korea

TEL: +82-55-360-5103 FAX: +82-2-364-0992

E-mail: jorkim@pusan.ac.kr

악안면 영역의 다양한 조직 결손부를 회복하기 위한 방법으로 자가조직 이식술이 선호되어 왔으나 공여부 채취를 위한 2차적인 수술이 필요하고, 이로 인해 환자에게 신체적, 경제적 고통을 가중시키는 단점이 있어 최근에는 조직공학을 이용하여 결손된 조직을 회복하려는 연구들이

비교적 활발히 진행되고 있다. 조직공학이란 생명과학과 공학의 기본 개념과 기술을 통합 응용하여 생체조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하고 응용하여 생체조직의 대체물을 만들어 이식함으로써 신체의 기능을 유지, 향상 또는 복원시키는 것을 목적으로 하는 학문이다. 이러한 조직공학을 이용한 재생의학의 위해서는 다양한 줄기세포 또는 미분화 전구세포가 필수적으로 필요하다. 줄기세포에 대한 연구는 1981년 Evans 등¹이 쥐의 배아줄기세포를 확립하는데 성공한 후, 줄기세포의 무한한 자가재생능과 모든 세포로 분화가 가능한 전능성에 대한 연구가 본격적으로 진행되었다. 현재 이러한 줄기세포는 기원에 따라 크게 배아줄기세포, 태아줄기세포, 성체줄기세포로 분류된다². 배아줄기세포는 착상 전후의 수정란이 배아에서 분리하는 반면, 성체줄기세포는 골수, 채장, 지방, 근육, 혈액, 제대혈, 골막, 모낭 및 피부, 그리고 치아조직 등의 다양한 조직에서 추출과 배양이 연구되었다^{1,3}. 성체줄기세포는 기존의 배아줄기세포와는 다른 배양조건과 그 가능성 때문에 많은 관심과 연구가 이루어지며, 특히 종교 및 윤리적인 면에서 배아줄기세포보다 자유로울 수 있어 줄기세포를 이용한 조직재생에 대한 연구는 성체줄기세포가 주를 이루고 있다^{1,4,5}.

최근 치의학 분야에서도 성체줄기세포를 이용한 결손조직 재생에 많은 관심이 집중되고 있으며, 주로 결손된 골 및 신경조직 재생이 중점적으로 연구되고 있다. Yamada 등^{6,7}과 Fuerst 등⁸은 골수유래 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)를 이식제와 혼합하여 실험동물의 상악동저에 주입한 결과 자가골을 이식한 경우와 같은 효과를 얻었다고 보고하였으며, Schimming 등⁹은 인간의 하악골 골막조직을 골세포로 분화 증식시킨 후 상업적 비계(scaffold)와 같이 혼합하여 상악동저 증강술에 사용한 증례들도 발표하였다. 이와 같은 인공치아 매식술을 위한 치조골 증강술 뿐 아니라 구개열을 비롯한 선천기형, 외상 및 종양 절제에 의한 후천적인 악골결손 등 악안면 영역에서의 골재생술의 필요성은 점진적으로 증가된다고 할 수 있다. 또한, 악안면 부위는 악골결손 외에도 다양한 원인에 의해 신경과 구강점막 및 피부 등 복합적인 조직의 재생이 필요할 수 있다. 현재까지는 이러한 조직결손의 회복을 위해 자가조직 이식술이 널리 이용되었으나 공여부 수술에 따른 합병증의 위험과 이식량이 제한적인 단점이 있다. 따라서, 자가조직을 소량 채취하여 이에서 줄기세포를 추출 배양한 후 이를 이용하는 조직공학적 조직재생법은 기존의 여러 가지 조직 이식술의 단점을 극복할 수 있는 획기적인 방법이 될 것으로 여겨진다.

조직공학을 위해 필요한 줄기세포는 전술한 바와 같이 다양한 조직에서 추출 및 배양이 가능하며, 각각의 조직기원에 따라 장, 단점 등의 특징이 구분된다. 이들 중 현재까지는 골수나 지방유래 성체줄기세포가 비교적 활발히 연

구되고 있다. 하지만, 이러한 신체 내부의 조직을 획득하기 위한 과정이 또한 침습적일 수 있기에 최근에는 보다 쉽게 얻을 수 있으면서 다능성이 뛰어난 조직에서 줄기세포를 추출하기 위한 노력이 있어왔고, 치아조직유래 줄기세포도 이의 일환으로 연구되었다. 치아줄기세포(dental stem cells)의 가장 큰 장점은 비교적 성인이 된 후에도 미분화 조직이 잔존하기에 원시적이고 다능성인 줄기세포의 추출이 가능하고, 발치 후 폐기되는 매복지치나 유치의 조직을 줄기세포 공여부로 이용할 수 있다는 점이다.

인간의 치아줄기세포에 대한 연구는 2000년 Gronthos 등^{10,11}이 매복지치의 치수에서 성체줄기세포(dental pulp stem cells, DPSCs)를 추출하여 골수유래 줄기세포와 유사한 특성을 발견한 것이 처음이었다. 이후 몇몇의 연구자들이 영구치 외에 탈락하는 유치(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)^{12,13}나 과잉치¹⁴ 등의 치수에서도 다능성의 특징을 가진 줄기세포의 추출을 성공적으로 보고하였다. 또한, 치수 외에 치낭(dental follicle cells, DFCs)^{15,16}, 치근유두(stem cells from root apical papilla, SCAP)¹⁷, 치주인대(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)¹⁸ 등의 조직에서도 치아줄기세포들의 추출이 성공하였고 그 특징들이 부분적으로 연구되고 있다. 현재 이러한 치아줄기세포들간의 특성의 차이에 대해 조심스럽게 연구되고 있는데, Sonoyama 등¹⁹이 치근유두유래 줄기세포가 치수유래 줄기세포에 비해 성장률과 상아질 같은 광화 기질 생성률이 높은 것을 관찰하였고, 최근에는 Morsczeck 등²⁰이 유치치수유래 줄기세포와 치낭유래 줄기세포의 *in vitro*에서의 신경분화능력을 비교하여 두 치아줄기세포가 완전히 다른 분화능력과 특성을 가진다고 하였다. 이와 같이 같은 개체에서 발생한 치아조직이지만 그 줄기세포의 추출 및 분화 능력은 서로 다를 수 있다. 하지만, 현재까지는 상기의 몇몇 제한된 연구 외에는 다양한 치아조직유래 줄기세포들간의 특성의 차이에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구는 같은 개체의 미성숙 매복지치에서 치낭(dental follicle, DF), 치수(dental pulp, DP), 치근유두(root apical papilla, RAP) 조직을 분리하고, 이들 조직에서 각각 치낭유래 세포, 치수유래 세포, 치근유두유래 세포를 추출한 후 이들의 특성을 비교 분석하여 차후 조직공학에 이용시 어떤 치아조직유래 세포를 가장 유용하게 사용할 수 있을 것인지를 조사하고자 시행하였다. 이를 위해 연구 지원 자료부터 발치한 하악 매복지치에서 3가지 치아조직을 분리하고 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, Sox-2의 발현과 간엽성 줄기세포의 표지자인 CD44, CD90, CD105의 발현 정도를 관찰하여 이들 세포들이 다능성(pluripotent or multipotent)의 특징을 가진 줄기세포인지 검증하였다. 또한, 각각의 치아조직유래 세포들을 골세포 및 지방세포로 각각 분화 유도하여 각 치아조직유래 세포들간의 분화 정도의 차이를 비교 분석하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 치아조직유래 세포의 추출 및 증식

치근이 미성숙된 하악 매복지치 발치(germinectomy of lower wisdom teeth) 환자 중 본 연구를 이해하고, 조직 공여에 동의한 4명의 환자(남자 2명, 여자 2명, 17-19세)에서 발치한 하악 매복지치로부터 즉시 치낭, 치근유두, 그리고 치수조직을 멸균상태에서 각각 분리하였다. 채취한 치아조직은 신선한 상태로 실험실로 옮겨 100 U/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin이 함유된 소독된 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Invitrogen, MD, USA)로 수 차례 세척한 후 각각의 조직을 약 1-3 mm²의 크기로 잘게 분리하였다.

잘게 분리된 각각의 치아조직을 collagenase로 digestion시키기 위하여, 먼저 calcium과 magnesium이 함유되지 않고 type I collagenase (Sigma, MO, USA)가 함유된 DPBS에 담근 후 37°C에서 30분간 배양(incubation) 하였다. 이후 PBS로 2-4회 세척하고, PBS에 37°C에서 10분간 배양한 후 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen)을 배양액에 첨가시키고 500 ×g에서 5분간 원심분리 하였다. 이후 상층액을 제거하고 DPBS를 1 mL 첨가한 후 100 µm 크기의 nylon cell strainer를 통과시켜서 세포덩어리들을 제거하였다. 다시 500 ×g에서 5분간 원심분리하고, 상층액을 제거한 후 잔존 세포들을 10% FBS, 100 U/mL penicillin (Sigma), 그리고 100 µg/mL streptomycin (Sigma)을 첨가한 ADMEM (Sigma)에 부유시켜 35 mm 또는 60 mm 크기의 조직배양판(tissue culture plates) (Nunc, Denmark)에 넣고 37°C, 5% CO₂와 humidity 조건에서 조직배양하였다. 이 시기에는 배지를 하루에 한번씩 교체하고, 3일 후부터는 3일에 한번씩 배지를 교체하며, confluent cells은 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Invitrogen)으로 처리 후 계대배양(subculture) 하였다. 일차배양(primary culture)은 2주 동안 이루어지며, 이후 1주마다 계대배양이 이루어졌다.(Fig. 1)

2. 배양된 치아조직유래 세포의 세포 수 증식률(proliferation rate) 비교

세포의 증식률은 선행연구²⁾를 참조하여 이루어졌다. 이차 계대배양을 마치고 3차 계대배양(passage 3)이 이루어진 시점에서 passage 3의 첫째 날(day 1), 셋째 날(day 3), 여섯째 날(day 6), 그리고 아홉째 날(day 9)에 각각 배양되는 세포들을 일정한 비율로 사진을 채득한 후 cm² 당 세포 수를 계산하였다. 각각 측정일의 배양판을 40배의 현미경으로 보이는 세포 수를 계산하고 이를 다시 cm² 당 세포 수로 환산하여 각각의 시기마다 세포 수의 증감을 각각 비교하였다. 측정은 각 시기마다 각기 다른 부위를 최소 3회 이상 실시하여 평균 수를 계산하였다.

3. 배양된 치아조직유래 세포에서 RT-PCR을 통한 초기 전사인자의 발현검사

배양된 3종류의 치아조직유래 세포들에서 줄기세포 특성을 확인하기 위해 각각을 3번의 계대배양(passage 3)후 치아조직유래 세포를 배지에서 추출하여 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, 그리고 Sox-2에 대한 발현을 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통해 검사하였다. 배양된 세포에서 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하고, PCR 증폭을 위한 template인 cDNA는 oligo-dT primer를 가진 Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen)를 이용하여 55°C에서 30분간 합성하였다. PCR은 Maxime PCR Premix (iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 시행하였다. PCR은 95°C에서 3분간 denaturation과 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 elongation, 그리고 72°C에서 10분간 extension을 35-40 cycles로 실시하였다. 이후 1% agarose gel과 1 µg/mL ethidium bromide에서 전기영동(electrophoresis)으로 분리하고 자외선 조명에서 사진촬영하였다. 사용한 초기 전사인자(Oct-4, Nanog, 그리고 Sox-2)의 primer들은 Table 1에 나타나 있다.

Table 1. RT-PCR primers used for evaluating transcription factors in dental tissue-derived stem cells

Gene	Sequence of primer (5' - 3')	Amplification size	Tm (°C)	Locous
GAPDH	F - GAGTCAACGGATTGGTTCGT R - TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238	60	AB062273
04-Oct	F - GATCCTCGGACCTGGCTAAG R - GACTCCTGCTTCACCCTCAG	213	60	AM851115
Nanog	F - CAAAGGCAAACAACCCACTT R - TCTGGAACCAGGTCTTCACC	218	60	AB093576
Sox-2	F - TCACGTACACTGCCCTGAAG R - TGCAACGGATTGTGTTGTTT	175	60	Z31560

(RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

4. 배양된 치아조직유래 세포에서 fluorescence-activated cell sorting (FACS) 분석을 통한 간엽성 줄기세포 표시자의 발현검사

세 가지 치아조직유래 세포들에서 각각의 세포표면 표시자(cell surface markers)를 검사하기 위해서 3차 계대배양을 마친 세포들을 flow cytometer (BD FACS Calibur, Becton Dickinson, USA)을 이용하여 분석하였으며, 각각의 분석은 3회 반복하여 오차를 줄였다. 3차 계대배양한 세포가 약 90%의 confluence에 도달하면 0.25% EDTA를 이용하여 세포를 분리하고 10% FBS가 함유된 DPBS로 2회 세척하고 간엽성 줄기세포의 표시자인 CD44, CD90, 그리고 CD105의 발현 정도를 관찰하였다. 이들 항체는 모두 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 복합된(FITC conjugated CD makers) 것으로 Rat anti-mouse CD44 (1:100, BD Pharmingen, CA, USA), Mouse anti-human CD90 (1:100, BD Pharmingen), 그리고 Goat anti-Mouse CD105 (1:100, BD Pharmingen)를 각각 사용하였다.

5. 치아조직유래 세포의 골 및 지방세포로의 분화

추출 및 배양한 3종류의 치아조직유래 세포들을 골세포로 분화시키기 위해 3차 계대배양한 치아조직유래 세포가 약 70% confluence에 도달하면 10 nM dexamethasone, 10 mM sodium β -glycerophosphate, 그리고 50 μ M ascorbic acid를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지 (골세포 유도배지)로 교체하였다. 지방세포 유도를 위해서도 추출한 치아조직유래 세포를 10 nM dexamethasone, 0.5 mM indomethacin, 5 μ g/ml insulin, 100 mM 3-sodium isobutyl-1-methylxanthine, 그리고 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지(지방세포 유도배지)로 교체하였다. 각각의 배지는 1주에 2번씩 교체하면서 3주 동안 배양하고, 분화된 세포는 조직화학염색과 RT-PCR을 통해 확인하였다.

6. 면역조직화학염색을 이용한 골 및 지방세포의 평가

각각의 치아유래 줄기세포에서 골세포로 유도된 배지의 골기질을 평가하기 위하여 von Kossa 염색을 실시하였으며, 이를 위해 3주 동안 골세포로 유도 배양한 세포를 PBS로 세척하고, 4% 중성 formaldehyde에 30분간 실온에서 고정하였다. 증류수로 세척 후 5% silver nitrate solution (Sigma)을 처리하고 암실에서 1시간 유지하였다. 증류수로 세척하여 여분의 silver nitrate solution을 제거하고, 색의 발현을 위해 sodium carbonate/formaldehyde solution을 수분간 처리하였다. 잔존의 silver nitrate는 5% sodium thiosulfate를 처리하여 중화시켰다. 세포핵은 hematoxylin액으로 5분간 대조염색하였다.

지방세포로 유도 배양된 세포는 oil-red O 염색으로 지방

세포 유무를 확인하였으며, 이를 위해 지방세포 분화배지에서 3주간 배양한 세포를 PBS로 세척하고 4% formaldehyde로 고정한 후 6 mL의 stock oil-red O (Sigma)에 4 mL의 이중 증류수를 첨가한 oil-red O working solution을 처리하고 실온에서 1시간 유지하였다. 증류수로 수 차례 세척과 건조 후 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. 치아조직유래 세포의 추출 및 증식

세 종류의 치아조직을 잘게 분리한 후, collagenase type I 효소를 이용해 단일세포(single cell)로 만든 직후에는 배양판에 부착되지 않은 둥근 세포들을 드물게 관찰할 수 있었다. 이후 치아조직에서 추출한 세포는 초기 배양기간(약 10-14일) 동안 다양한 크기와 형태의 세포들이 관찰되면서 세포군락(colony) 형성도 관찰되었다. 초기배양 시 다양한 모양을 보이던 세포들은 2차 및 3차 계대배양 이후 비교적 형태가 균일하고 일정한 증식률을 보이는 세포들로 관찰되었다.(Figs. 1, 2)

2. 세포 수 증식률(proliferation rate)

2차 계대배양을 마치고, 3차 계대배양 시 3종류의 치아조직유래 세포들의 증식률을 비교하였다. 3차 계대배양 첫째 날, 셋째 날, 여섯째 날, 그리고 아홉째 날의 cm^2 당 세포 수를 계산하여 세포 수가 증가하는 비율을 구하였으며, 치근유두유래 세포가 가장 빠르게 증식하는 것이 관찰되었다. 특히 치근유두유래 세포는 셋째 날에서 여섯째 날 사이에 가장 급격히 증가하였다. 다음으로 치낭유래 세포가 빨리 증식하였고, 치수유래 세포의 증식률이 가장 낮게 나타났다.(Figs. 3, 4)

3. 초기 전사인자의 발현

삼차 계대배양한 3가지 치아조직유래 세포에서 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, 그리고 Sox-2의 발현이 RT-PCR로 모두 관찰되었으나, Sox-2 유전자는 치수유래 세포에서는 거의 관찰되지 않았다. 세 종류의 치아조직유래 세포 중에서는 특히 치근유두유래 세포에서 가장 많은 전사인자의 발현이 관찰되었다.(Fig. 5)

4. 간엽성 줄기세포 표시자의 발현

삼차 계대배양한 3종류의 치아조직유래 세포 모두에서 간엽성 줄기세포의 표시자인 CD44, CD90, 그리고 CD105의 발현을 FACS 분석으로 관찰할 수 있었다. 각각의 세포군에서 특별한 발현율의 차이는 없었지만, CD105는 치수



Fig. 1. A. Schematic illustrations of dental pulp (DP), root apical papilla (RAP), and dental follicle (DF) in the extracted impacted wisdom tooth. B. Photograph of the obtained dental tissues after treatment of mechanical dissociation and enzyme (collagenase I) digestion. (Pa: root apical papilla tissue, F: dental follicle tissue, Pu: dental pulp tissue)

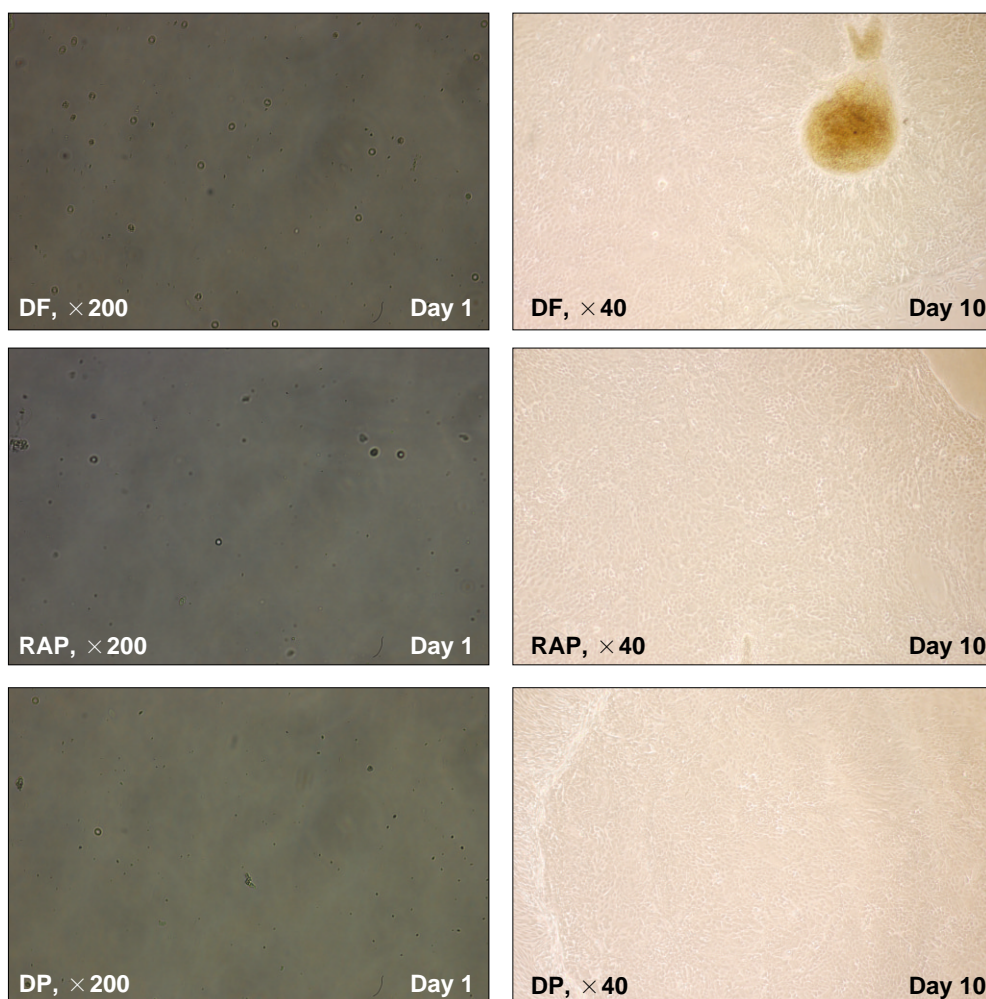


Fig. 2. Isolation and primary culture of dental tissue-derived cells. Microphotographs of dental follicle-derived cells (DF), root apical papilla-derived cells (RAP), and dental pulp-derived cells (DP) at 1st and 10th days later of primary culture (passage 0). At 1st day of primary culture, round shaped unattached floating primary cells were rarely observed in the culture media. When the culturing cells reached nearly 70-80% confluence of primary culture (10th day of primary culture), remarkably increased cell number and irregular heterogeneous shaped dental tissue-derived cells were observed. In this primary culture period, there are no definitely morphological differences between these three dental tissue-derived cells.

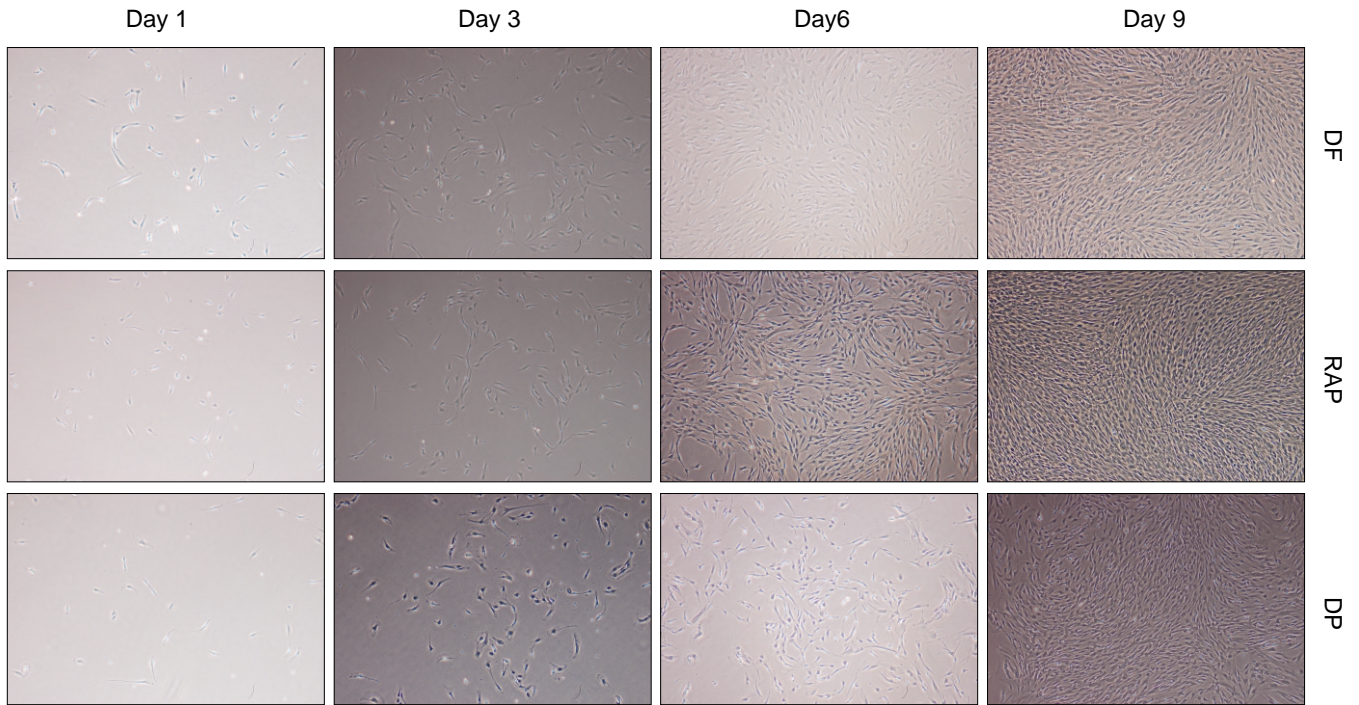


Fig. 3. Sequential cell proliferations of the third passaged dental tissue-derived cells.(original magnification x100) RAP-derived cells showed the most prominent proliferation rate, especially between 3rd and 6th days of subculture, there is remarkable increase of cell number. However, DF and DP-derived cells showed the remarkable cell number increasing between 6th and 9th days of subculture.
(DP: dental pulp, RAP: root apical papilla, DF: dental follicle)

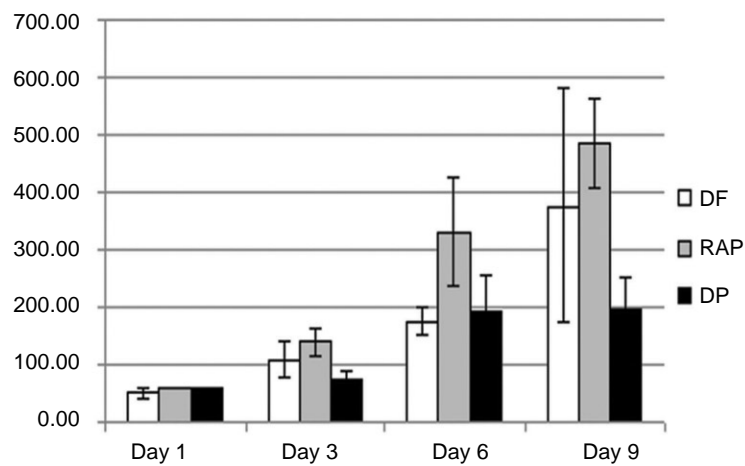


Fig. 4. Graphs showed the increasing numbers of *in vitro* cultured cells as time passed. The most prominent cell proliferation rate was observed in the RAP-derived cells.
(DP: dental pulp, RAP: root apical papilla, DF: dental follicle)

또는 치근유두유래 세포들에서보다 치낭유래 세포에서 가장 많은 발현이 관찰되었다.(Fig. 6)

5. 골세포 및 지방세포로의 분화

세 종류의 각기 다른 치아조직유래 세포를 4주 동안 골세포로 유도 배양한 후 von Kossa와 alizarin red 염색으로 골기질을 염색하였다. 치낭 및 치근유두유래 세포에서는 모두 활발한 골기질 형성을 관찰할 수 있었고, 특히 치근유두유래 세포에서 골기질 형성이 가장 활발함을 관찰할 수 있었다. 이에 반해, 치수유래 세포에서는 같은 기간 동안 골세포로 유도한 배지에서 다른 치아조직 유래 세포에서 보다 비교적 약한 골기질 형성을 관찰할 수 있었다.(Fig. 7)

모든 3종류의 치아조직유래 세포를 지방세포로 4주간 유도 배양한 후 oil-red O 염색 결과 붉게 양성으로 나타나는 지방세포를 관찰할 수 있었다. 이 시기 가장 강하게 지방세포로의 분화를 보이는 세포는 치낭유래 세포로 다른 두 종류의 치아조직유래 세포에서보다 월등히 많은 지방세포를 관찰할 수 있었다.(Fig. 8)

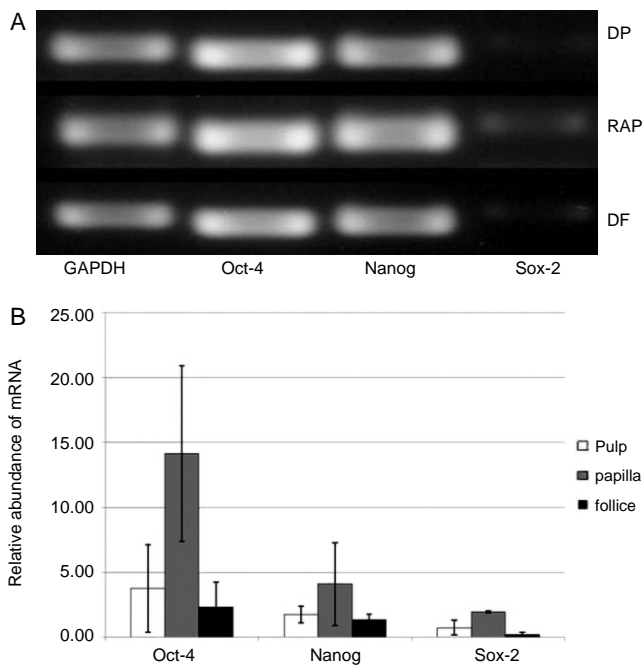


Fig. 5. Expression of transcription factors, Oct-4, Nanog, and Sox-2 in the cultured dental tissue-derived cells of passage 3 by RT-PCR. A. Although Sox-2 gene was weakly observed, these transcription factors were all detected in the dental tissue-derived cells. B. Quantification of transcription factors expressions. Transcription factors were most strongly detected in the root apical papilla-derived cells. (RAP)

(GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, DP: dental pulp, RAP: DF: dental follicle, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction)

IV. 총괄 및 고찰

줄기세포란 단일세포로서 자가재생 능력과 성숙된 전구세포 및 최종 목적세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 줄기세포는 기원에 따라 크게 배아줄기세포, 태아줄기세포, 성체줄기세포로 분류되고, 분화능력에 따라 totipotent (모든 배아 및 배아 외적 세포로 분화할 수 있는 능력), pluripotent (배아상태의 모든 세포로 분화할 수 있는 능력), multipotent (2가지 및 3가지 배엽의 세포로 분화할 수 있는 능력), oligopotent (multipotent 줄기세포보다 더 제한적인 배엽의 세포로 분화할 수 있는 능력), unipotent (오직 1가지 성숙된 세포로 분화할 수 있는 능력) 등으로 분류할 수 있다².

Oct-422, Sox-223, 그리고 Nanog²⁴는 다능성 배아줄기세포(pluripotent embryonic stem cells)에 강하게 발현되는 초기 전사인자로, 지금까지 연구에는 인간 및 생쥐의 배아줄기세포에서만 강하게 발현되고, 이를 제외한 postnatal stem cells인 골수, 제대혈, 양수, 지방, 피부 등의 성체줄기세포에서는 강하게 발현되지 않는다고 알려져 있다. 이 3가지

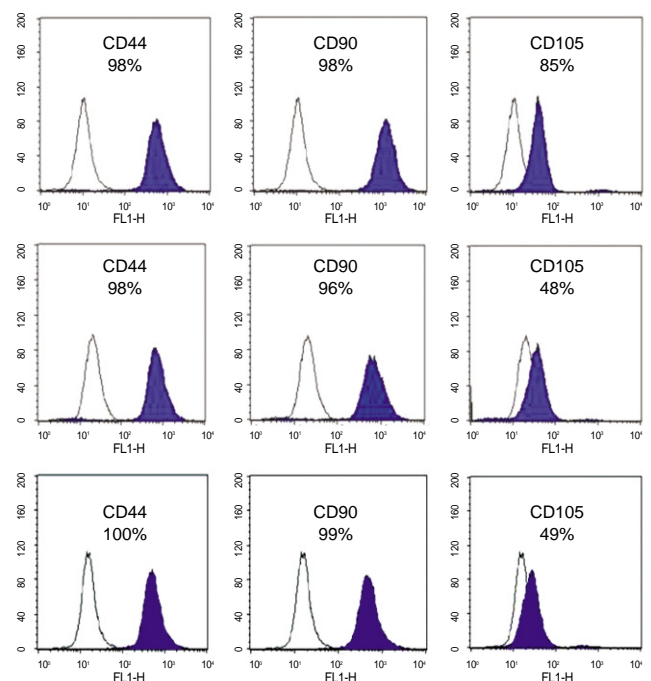


Fig. 6. Expressions of cell surface markers with FACS analysis. Mesenchymal stem cell marker proteins were detected in the all three types of dental tissue-derived cells.

A. Dental follicle cells. B. Dental pulp cells. C. Root apical papilla cells.

(FACS: fluorescence-activated cell sorting)

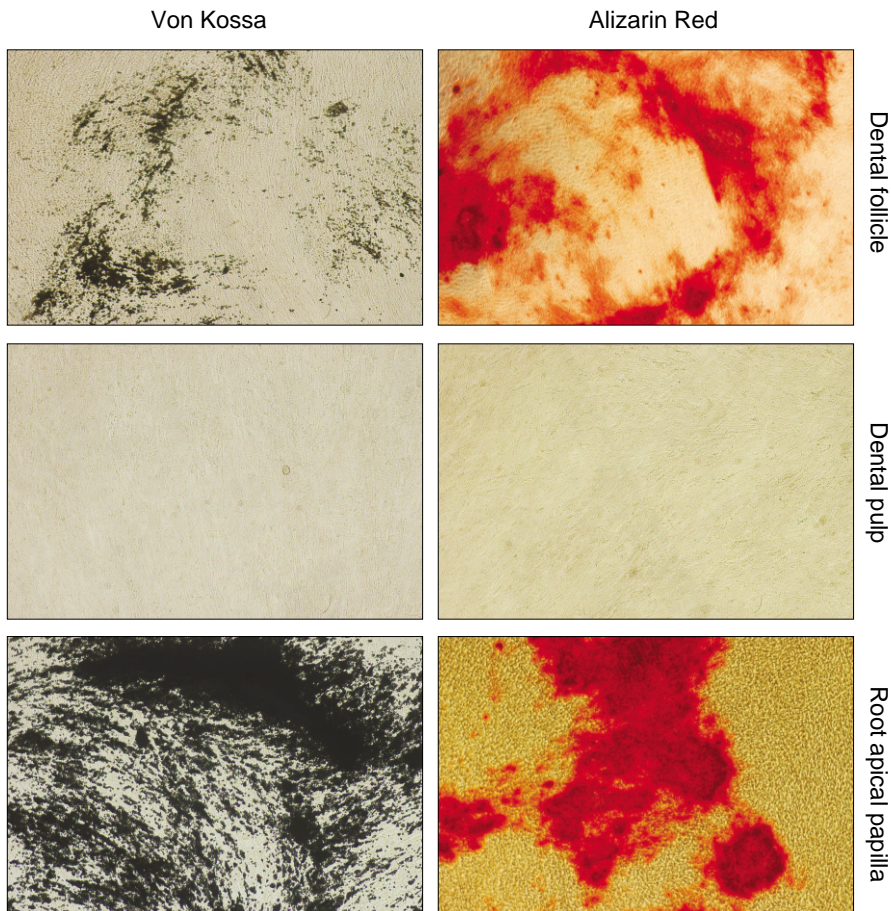


Fig. 7. Osteogenic differentiations of dental tissue-derived stem cells for 4 weeks. The most abundant bone matrix formation was observed in the RAP cells, whereas it was rarely detected in the DP cells by von Kossa and alizarin red stainings. (DP: dental pulp, RAP: root apical papilla)

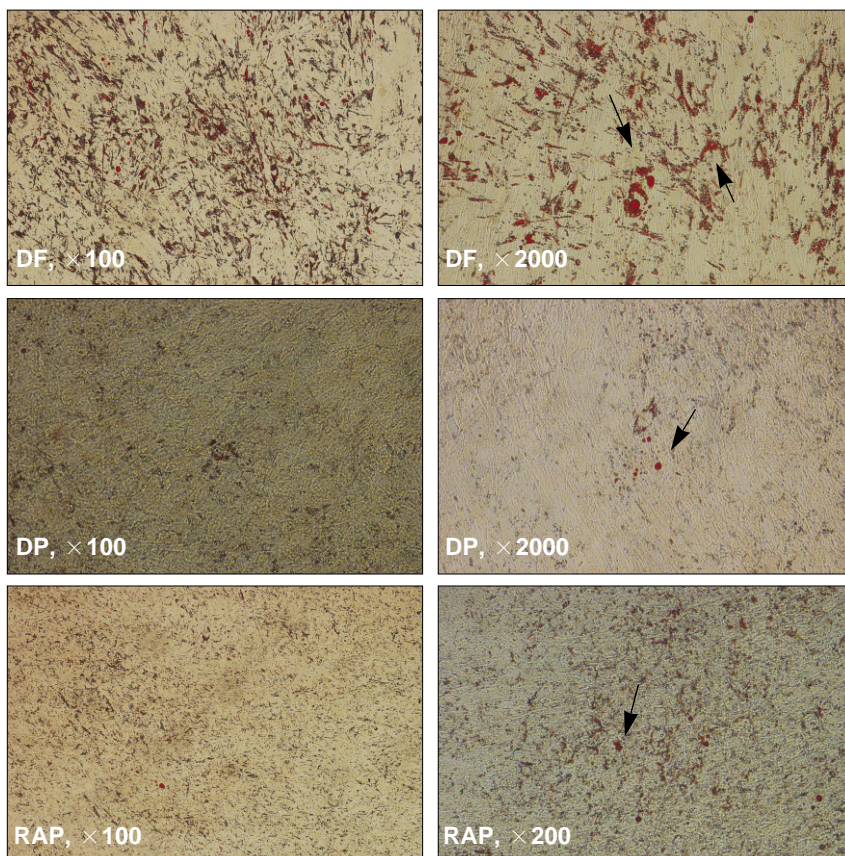


Fig. 8. Adipogenic differentiation of dental tissue-derived stem cells for 4 weeks.(original magnification x100) Small red color stained lipid nodules were detected in all three types of dental stem cells by oil-red O staining.(arrows) Most actively adipogenic differentiation was showed in the dental follicle-derived cells.

전사인자는 최소한 2,260개의 인간 유전자의 프로모터(promoter)에 관여하며, 3전사인자가 공동으로 관여하는 유전자도 353가지나 된다²⁵. 따라서 이들 3전사인자는 공동으로 또는 각자 단독으로 인간 배아줄기세포의 다능성(pluripotency)과 자가재생성(self renewal)을 조절하며, 줄기세포의 전사에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다^{26,27}. 흥미로운 것은 최근의 연구들에 의하면, 이들 전사인자가 배아줄기세포에서뿐만 아니라, 골수유래 간엽성 줄기세포²⁸, 지방유래 간엽성 줄기세포²⁹, 치수유래 줄기세포³⁰, 태반기질세포²⁷, 그리고 피부유래 줄기세포^{21,31-33} 등과 같은 태생 후성체줄기세포(postnatal adult stem cells)들에서도 발현되는 것이 관찰되었다는 점이다. 즉, 이는 초기 전사인자들은 성체줄기세포에 거의 발현이 되지 않고 배아줄기세포에서만 강한 발현이 관찰된다는 기존의 가설을 바꾸는 연구들인 것이다. 본 연구에서도 3종류의 치아조직유래 줄기세포 모두에서 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, 그리고 Sox-2의 발현을 RT-PCR을 통해 관찰할 수 있었으나, Sox-2 유전자는 상대적으로 약하게 발현되었고, 특히 치낭유래 세포에서는 Sox-2의 발현을 거의 관찰할 수 없었다. 또한, 치근유두유래 세포에서 가장 강한 전사인자들의 발현을 관찰하였고, 반대로 치낭유래 세포에서 가장 약한 전사인자의 발현을 관찰하였다. 이러한 결과는 이들 치아조직유래 세포 중 치근유두유래 세포가 가장 원시적이고 다능성(primitive pluripotent or multipotent)의 특징을 가진다는 의미로 해석될 수 있다. 이러한 결과는 Sonoyama 등¹⁹의 연구에서 치수유래 줄기세포보다 치근유두유래 줄기세포에서 다능성이 더 관찰되고 분화능력이 더 우수하다는 연구결과와 부분적으로 일치되는 결과이다. 또한, 선행된 연구에서는 인간과 유사한 유인원의 치수유래 줄기세포에서 Oct-4 같은 전사인자의 미약한 발현을 관찰하였는데³⁰, 본 연구에서는 이와는 다르게 치수유래 세포에서도 상당히 많은 양의 전사인자들의 발현을 관찰할 수 있었다. 즉, 비록 정도의 차이는 있지만, 본 연구에서 추출되고 배양된 3종류의 치아조직유래 세포 모두 다능성을 가지는 원시세포의 특징을 가진다고 볼 수 있을 것이다.

최근에 조직공학적인 조직재생에 대한 요구가 증가하면서 성체줄기세포 중 간엽성 줄기세포(MSC)에 대한 관심이 증가하고 있다. 현재까지 간엽성 줄기세포는 전술한 바와 같이 인간이나 동물의 골수, 지방, 근육, 제대혈, 순환혈액, 피부, 치아조직 등에서 추출 및 연구되었다. 이러한 간엽성 줄기세포는 몇 가지 특징을 가지는데, 첫 번째 특징은 일반적인 배양조건에서 배양판에 부착되어(plastic-adherent culture) 배양된다는 점이며, 두 번째 특징은 특정한 세포표면표시자(cell surface marker, CD marker)의 발현이 관찰된다는 점이다. 즉, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, 그리고 CD166 같은 표시자가 양성으로 관찰되고, CD45, CD34, CD14, 또는 CD11b 같은 표시자는 거의 관찰되지 않는 특징을 보인다. 마지막으로 세 번째 특징은 간엽성 줄기

세포를 특정 분화조건을 가진 배지상에서(*in vitro culture*) 분화시키면 골세포, 지방세포, 연골세포 등으로 성공적인 분화가 일어난다는 점이다^{34,35}. 따라서, 이러한 특징을 바탕으로 간엽성 줄기세포는 배양되는 세포의 물리적, 형태학적 특징과 몇 가지 표시자의 발현여부, 그리고 다양한 세포로의 분화가능여부 등으로 정의될 수 있다. 본 연구에서도 매복지치 발치 후 분리한 치낭, 치수, 치근유두유래 세포 모두에서 CD44, CD90, CD105의 발현을 관찰할 수 있었으며, 이러한 결과를 토대로 이들 3종류의 치아조직유래 세포 모두 간엽성 줄기세포의 특징을 가진다고 말할 수 있다.

현재까지 치아조직유래 줄기세포는 치수, 치낭, 치근첨부의 치유두(dental papilla), 그리고 치주인대 조직에서 추출되었다. 치수유래 줄기세포는 Gronthos 등¹⁰에 의해서 2000년 처음 발표되었으며, 치수조직은 발생학적으로 신경능(neural crest) 기원이지만, 골수유래 간엽성 줄기세포와 상당히 유사한 특성을 가진다고 하였다. 이러한, 치수유래 줄기세포는 매복지치, 하악 유전치, 그리고 정중과잉치 등의 치수에서 추출되었는데, 같은 치수유래 줄기세포도 그 기원에 따라 특성의 차이가 있음이 관찰되었다. 가장 큰 차이점은 유치의 치수유래 줄기세포는 hydroxyapatite/tricalcium phosphate와 같이 면역억제 쥐(nude mouse)의 피부하에 식립하면 골형성을 관찰할 수 있는데 반해^{12,13}, 성인 매복지치의 치수유래 줄기세포는 같은 조건에서 상아질과 치수 유사 구조물이 만들어 진다는 점이다¹⁰. 치낭유래 줄기세포는 Handa 등³⁶이 송아지의 치배에서 추출한 세포를 생체 내에 이식하여 백악질 유사 기질(cementum-like matrix) 형성을 보고한 것이 처음이며, 이후 Morsczeck 등¹⁵에 의해서 인간의 지치 발치 후 치낭 조직에서 다능성 특징을 가진 줄기세포의 추출이 보고되었다. Seo 등¹⁸은 치주인대유래 줄기세포를 추출하여 생체 내 이식 시 백악질과 치주조직이 형성됨을 관찰하여 2004년 처음 보고하였다. 치근유두 줄기세포는 Sonoyama 등¹⁹에 의해서 보고되면서, 치수유래 줄기세포보다 분화능력이나 상아질 형성 능력이 더 뛰어나다고 하였다.

흥미로운 것은 몇 가지 선행된 연구에서 치수유래 줄기세포는 골수유래 간엽성 줄기세포나 다른 성체줄기세포보다 분화능력이 낮으며, 특히 지방세포로의 분화능력이 현저히 떨어진다고 하였다^{10,11,31}. 이에 비해 치근유두나 치주인대 줄기세포는 좀 더 활발한 분화능력을 보이며, 특히 골세포 분화와 백악질 등의 치주조직 분화에 장점을 가진다고 하였다^{18,19}. 본 연구에서도 선행된 연구들과 유사한 결과들을 관찰할 수 있었는데, 특히 치수유래 줄기세포는 골세포 분화능력이 현저히 떨어짐을 관찰할 수 있었다. 또한, 지방세포로의 분화에서는 선행된 연구에서와 같이 활발한 지방세포로의 분화는 관찰할 수 없었지만, 3종류의 치아조직 줄기세포 중 치낭 줄기세포에서 가장 활발한 지방세포 분화를 관찰할 수 있었다. 즉, 3종류의 치아유래 줄기세포 모두에서 정도의 차이는 있지만, 골세포와 지방세포로의

성공적인 분화가 일어남을 관찰하였고, 이는 3종류의 치아 조직유래 줄기세포가 다능성의 특징을 가졌다는 의미로 해석할 수 있다.

본 연구로 그 동안 발치 후 버려지는 지치 주변 조직에서 줄기세포의 추출과 배양이 가능함을 관찰하였고, 특히 치근유두유래 세포에서 강한 초기 전사인자와 간엽성 줄기세포 표시자의 발현이 관찰되는 것으로 보아 가장 원시성이 높지 않나 추측한다. 또한, 분화실험에서 치근유두유래 세포는 골세포로 분화되는데 가장 활발하고, 치낭유래 세포는 지방세포로 분화되는데 장점이 있음이 관찰되었다. 향후 추가적인 연구가 진행되어야 하겠지만, 이러한 결과를 바탕으로 다양한 재생의학에 치아줄기세포를 활용할 수 있을 것이며, 특히 발치한 치아조직을 장기 보존한 후 이에서 줄기세포를 추출할 수 있는 연구가 수행된다면, 현재의 제대혈 보존과 같이 치아조직 또는 치아조직유래 줄기세포를 장기 보존하여 유용하게 사용할 수도 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

저자는 본 연구를 이해하고 조직제공에 동의한 4명의 환자에서 미성숙 하악 매복지치를 발치한 후 치낭, 치수, 치근유두 조직을 각각 분리하고, 이를 배양하여 각각의 치아 조직유래 세포를 추출하였다. 세 종류의 치아조직유래 세포의 특성을 규명하기 위하여, 초기 전사인자의 발현과 세포표면 표시자의 발현을 조사하였다. 세 종류의 치아조직유래 세포에서 초기 전사인자인 Oct-4, Nanog, Sox-2의 발현을 관찰할 수 있었고, 또한 간엽성 줄기세포 표시자인 CD44, CD90, CD105의 발현을 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 미성숙 매복지치 조직으로부터 추출한 세포는 모두 미분화 원시적인 특성을 가지는 간엽성 줄기세포라 할 수 있다. 이들 3종류의 치아조직유래 줄기세포를 각각 골세포 및 지방세포로 유도 분화시킨 실험에서 모든 종류의 치아조직유래 줄기세포에서 골 및 지방세포로의 분화를 관찰할 수 있었다. 세 종류의 치아조직유래 줄기세포 중 치근유두유래 줄기세포에서 가장 활발한 골세포로의 분화를 관찰할 수 있었으며, 치수유래 줄기세포에서 가장 낮은 골세포로의 분화능력을 관찰하였다. 지방세포로의 분화 실험에서는 치낭유래 줄기세포에서 가장 활발한 지방세포로의 분화를 관찰하였으며, 이들 3종류의 치아조직유래 줄기세포에서 각각 분화능력에 차이가 있음을 관찰하였다.

References

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
2. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-48.

3. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, *et al.* Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 2006;85:966-79.
4. Almeida-Porada G, Porada C, Zanjani ED. Adult stem cell plasticity and methods of detection. *Rev Clin Exp Hematol* 2001;5:26-41.
5. Temple S. Stem cell plasticity-building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:513-20.
6. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, *et al.* Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2003;31:27-33.
7. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:589-97.
8. Fuerst G, Tangl S, Gruber R, Gahleitner A, Sanroman F, Watzek G. Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: preliminary findings. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:733-40.
9. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:724-9.
10. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13625-30.
11. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81:531-5.
12. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, *et al.* Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5807-12.
13. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikui T, Akiyama K, *et al.* SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis* 2008;14:428-34.
14. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med* 2008;37:571-4.
15. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005;24:155-65.
16. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, *et al.* *In vitro* differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int* 2005;29:567-75.
17. Reynolds AJ, Jahoda CA. Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. *Differentiation* 2004;72:566-75.
18. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-55.
19. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE* 2006;1:e79.
20. Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, *et al.* Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation *in vitro*. *Clin Oral Invest* [in press 2009 Jul 10].
21. Kang EJ, Byun JH, Choi YJ, Maeng GH, Lee SL, Kang DH, *et al.* *In vitro* and *in vivo* osteogenesis of porcine skin-derived mesenchymal stem cell-like cells with a demineralized bone and fibrin scaffold. *Tissue Eng Part A* 2010;16:815-27.
22. Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 1990;344:435-9.
23. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17:126-40.
24. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie

- S, *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003;113:643-55.
25. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005;122:947-56.
26. Kajahn J, Gorjup E, Tiede S, von Briesen H, Paus R, Kruse C, *et al.* Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *Eur J Cell Biol* 2008; 87:39-46.
27. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4:8.
28. Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 2005;14:440-51.
29. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 2008;26:664-75.
30. Cheng PH, Snyder B, Fillos D, Ibegbu CC, Huang AH, Chan AW. Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biol* 2008;9:20.
31. Dyce PW, Zhu H, Craig J, Li J. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:651-8.
32. Zhao M, Isom SC, Lin H, Hao Y, Zhang Y, Zhao J, *et al.* Tracing the stemness of porcine skin-derived progenitors (pSKP) back to specific marker gene expression. *Cloning Stem Cells* 2009;11: 111-22.
33. Choi MJ, Byun JH, Kang EJ, Rho GJ, Kim UK, Kim JR, *et al.* Isolation of porcine multipotential skin-derived precursor cells and its multilineage differentiation. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2008;34:588-93.
34. Park BW, Hah YS, Kim DR, Kim JR, Byun JH. Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *Arch Oral Biol* 2007;52:983-9.
35. Rho GJ, Kumar BM, Balasubramanian SS. Porcine mesenchymal stem cells - current technological status and future perspective. *Front Biosci* 2009;14:3942-61.
36. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, *et al.* Cementum matrix formation *in vivo* by cultured dental follicle cells. *Bone* 2002;31:606-11.