

사람 골 형성 단백질 Ex vivo 유전자 치료법을 이용한 척추 유합

김기범 · 김재룡* · 안면환† · 서재성†

영남대학교 의과대학 의학과, 영남대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실*, 정형외과학교실†

Spinal Fusion Based on Ex Vivo Gene Therapy Using Recombinant Human BMP Adenoviruses

Gi Beom Kim, Jae Ryong Kim*, Myun Hwan Ahn†, Jae Sung Seo†

College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

**Department of Biochemistry · Molecular Biology and*

†Department of Orthopaedic Surgery,

College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

—Abstract—

Purpose : Bone morphogenetic proteins (BMPs) play an important role in the formation of cartilage and bone, as well as regulating the growth of chondroblasts and osteoblasts. In this study, we investigated whether recombinant human BMP adenoviruses are available for ex vivo gene therapy, using human fibroblasts and human bone marrow stromal cells in an animal spinal fusion model.

Materials and Methods : Human fibroblasts and human bone marrow stromal cells were transduced with recombinant BMP-2 adenovirus (AdBMP-2) or recombinant BMP-7 adenovirus (AdBMP-7), referred to as AdBMP-7/BMSC, AdBMP-2/BMSC, AdBMP-7/HuFb, and AdBMP-2/HuFb. We showed that each cell secreted active BMPs by alkaline phosphatase staining. Since AdBMP-2 or AdBMP-7 transducing cells were injected into the paravertebral muscle of athymic nude mice, at 4 weeks and 7 weeks, we confirmed that new bone formation occurred by induction of spinal fusion on radiographs and histochemical staining.

Results : In the region where the AdBMP-7/BMSC was injected, new bone formation was

observed in all cases and spinal fusion was induced in two of these. AdBMP-2/BMSC induced bone formation and spinal fusion occurred among one of five. However, in the region where AdBMP/HuFb was injected, neither bone formation nor spinal fusion was observed.

Conclusion : The osteoinductivity of AdBMP-7 was superior to that of AdBMP-2. In addition, the human bone marrow stromal cells were more efficient than the human fibroblasts for bone formation and spinal fusion. Therefore, the results of this study suggest that AdBMP-7/BMSC would be the most useful approach to ex vivo gene therapy for an animal spinal fusion model.

Key Words: Spine, Spinal fusion, BMP, Gene therapy

서 론

골 형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP)은 transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily에 속하는 성장인자의 하나이다. 포유동물에서 조직 줄기세포(stem cell)에 작용하여 골세포 및 연골세포로 분화를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 1960년대 탈회화 시킨 골에서 처음으로 골 형성 단백질이 추출된 이래 지금까지 총 15 종류가 밝혀져 있으며, 이 중에서 골 형성을 유도하는 것은 BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6, BMP-7이 있다.²⁾ 골 형성 단백질은 골 형성 및 골 재생이 필요한 근·골격계의 질환을 치료하는데 있어 매우 유용하므로, 이를 임상에 이용하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 그 중에서도 골 조직에서 분리·정제한 골 형성 단백질, 유전공학 기법에 의해 생산된 재조합 골 형성 단백질이 임상적으로 많이 활용되고 있다. 골 형성 단백질을 직접적으로 이용한 치료는 단백질의 불안정성, 낮은 특이적인 활성,³⁾ 고가의 치료비용, 적절한 단백질 운반체 개발의 어려움 등으로 인해 제약을 받고 있다. 이로 인해

최근에는 골 형성 단백질 유전자를 이용한 유전자 치료법이 많이 연구되고 있다.⁴⁾

유전자 치료법은 특정 유전자를 특정 세포로 운반하여 기존의 생리적인 상태나 병적 과정을 변형시켜 치료 효과를 얻는 방법이다.³⁾ 특정 세포로 유전물질을 운반하기 위해서는 비바이러스 벡터와 바이러스 벡터를 이용하는데, 비 바이러스 벡터에 비해 형질도입 효율이 매우 높은 바이러스 벡터가 많이 사용된다. 유전자 치료법에 많이 사용되는 바이러스 벡터는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스, 아데노류 바이러스 등이 있다.⁵⁻⁹⁾ 특히, 아데노바이러스는 다른 바이러스 벡터에 비해서 안전하고, 대부분의 세포에 감염이 가능하며 고농도의 바이러스 제조가 가능하기 때문에 가장 널리 사용되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾

유전자 치료법은 특정 유전자를 숙주세포로 운반하는 방법에 따라 생체 외(ex vivo) 치료법과 생체 내(in vivo) 치료법으로 구분된다. 생체 외 치료법은 사람이나 동물의 골수,¹¹⁾ 피부조직,¹²⁾ 근육¹³⁾으로부터 세포를 추출하여 배양하고, 특정 유전자를 형질도입 시킨 후, 다시 사람이나 동물로 이식하는 방법이다. 생체 내

치료법은 특정 유전자를 가진 재조합 바이러스를 직접 숙주동물로 주입하는 방법이다. 생체 내 유전자 치료법은 생체 내에 존재하는 바이러스에 대한 항체로 인해 재조합 바이러스가 소실된다든지, 원하는 표적세포로 효과적으로 유전자를 전달하여 발현시키는데 어려운 점이 있다.⁴⁾ 특히, 미국에서 아데노바이러스 벡터를 이용한 생체 내 유전자 치료법으로 환자가 사망하여 생체 내 유전자 치료법의 임상적용이 금지된 상태이다. 따라서 생체 외 유전자 치료법이 선호되고 있다.

골 형성 단백질은 두개·안면골 결손,¹⁴⁻¹⁸⁾ 장골 결손,¹⁹⁾ 척추 유합 등과 같은 근·골격계 질환에 많이 활용되고 있다. 특히, 척추 유합술은 척추에 생기는 여러 질환 -디스크, 퇴행성 척추 질환, 척추 기형, 척추 외상 등-의 치료에 가장 기본이 되는 수술 치료 방법이다. 척추 유합술은 대부분 환자 자신의 골반에서 채취한 골편을 이용하여 유합술을 시행하는데, 이 방법은 골 생성 능력, 생체적합성, 물리적 특성 등, 여러 면에서 가장 우수한 것으로 알려져 있다. 그러나 직접 골 채취에 따른 수술 시간의 연장, 출혈, 혈종, 둔부 마비감, 감염, 이상 감각, 입원기간의 연장, 탈장 등의 부작용도 30%까지 보고되고 있다.²⁰⁾ 따라서 골 형성 단백질 유전자 치료법을 이용한 척추 유합 연구가 많이 시도되고 있다. 특히, 골 형성 단백질-2(BMP-2)와 -7(BMP-7)을 이용한 유전자 치료법이 쥐와 토끼의 척추 유합 모델에 많이 활용되고 있다.²¹⁻²⁸⁾ 현재까지 골 형성 단백질을 이용한 거의 대부분의 척추 유합 연구에서 골수기질세포가 사용되고 있다. 그러나 생체 내에서 골 형성 단백질을 유전자를 형질도입시킨 사람 섬유아세포도 골모세포로 분화될 수

있다는 보고도 있다.^{12, 29)} 그리고 섬유아세포가 골수기질세포에 비해 쉽게 조직으로부터 분리 배양할 수 있다. 따라서 사람 섬유아세포를 척추 유합 모델에 이용할 수 있다면 골수기질세포에 비해 더 유용할 것으로 생각된다. 또한, 골 형성 연구에서 가장 많이 사용되고 있는 BMP-2와 BMP-7에 대한 골 형성능을 생체 외 유전자 치료법을 이용하여 비교한 연구는 아직 보고되어 있지 않다.

이에 본 연구에서는 동물의 척추 유합 모델에서 재조합 BMP-2 아데노바이러스(AdBMP-2) 또는 재조합 BMP-7 아데노바이러스(AdBMP-7)을 형질도입시킨 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포의 골 형성능을 척추 유합 모델을 통해 조사하므로, 사람 섬유아세포도 사람 골수기질세포처럼 척추 유합에 유용한 생체 외 유전자 치료에 활용할 수 있는지, 그리고 척추 유합에 있어 BMP-2와 BMP-7 중 어느 것이 더 효과적인지 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

재조합 BMP-2 아데노바이러스(AdBMP-2), 재조합 BMP-7 아데노바이러스(AdBMP-7)는 영남대학교 의과대학 생화학·분자생물학 교실에서 제작하였다. 사람 섬유아세포는 영남의대 해부학교실 송인환 교수로부터 제공받았으며, 쥐의 근육모세포인 C2C12 세포는 한국세포주은행으로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)과 penicillin-streptomycin-fungizone 용액은 Life Technologies사, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone사, Adeno-X purification kit는 BD bioscience사, Histopaque-

1077와 alkaline phosphatase kit(Procedure No. 86-R)와 그 밖의 시약들은 Sigma-Aldrich 사로부터 구입하였다. 수컷 면역결핍 생쥐 (BALB/c-nu)는 중앙실험동물사로부터 구매하였으며 청정 사육실에서 사육하였다.

2. 사람 골수세포 분리 및 세포 배양

사람 골수기질세포는 24세 여자 환자의 장골에서 채취한 골수로부터 분리하였다. 골수채취와 골수기질세포의 분리·배양에 대해 미리 환자에게 설명하고 동의를 얻었다. 채취한 골수를 100 U/ml 헤파린인 든 용기에 담고 잘 흔들어서 주었다. 골수용액 6 ml를 Histopaque-1077 위에 조심스럽게 얹은 다음 3000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 용기의 중간에 형성된 세포층만 새 튜브에 옮기고 10 ml DMEM 배양액으로 세포를 한 번 세척하였다. 세포를 100 U/ml의 항생제 용액과 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 배양액은 3일마다 교체하였고 4주에서 8주간 배양 후(passage 3) 실험에 사용하였다.

사람 섬유아세포는 100 mm 배양접시에서 100 U/ml의 항생제 용액과 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 배양하였다. 배양액은 3일마다 교체하였고 2주간 배양 후 (passage 4) 실험에 사용하였다.

3. 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포로 AdBMP-2와 AdBMP-7의 형질도입.

사람 섬유아세포는 직경 100 mm, 사람 골수기질세포는 직경 150 mm의 세포 배양 용기에 각각 1×10^6 cells/dish로 분주하였다. 하루 밤 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고, 5 ml

DMEM에 AdBMP-2, AdBMP-7, AdLacZ 바이러스를 각각 2.50×10^8 viral particles/ml 농도로 희석한 후, 90분 동안 처리하였다. 10% FBS가 포함된 DMEM을 첨가 한 후, 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 밤새도록 배양하였다. AdBMP-7을 형질도입 시킨 사람 섬유아세포는 AdBMP-7/HuFb, AdBMP-2를 형질도입 시킨 사람 섬유아세포는 AdBMP-2/HuFb, AdLacZ를 형질도입 시킨 사람 섬유아세포는 AdLacZ/HuFb, 아무것도 처리하지 않은 사람 섬유아세포는 Mock/HuFb로 표기하였으며, AdBMP-7을 형질도입 시킨 사람 골수기질세포는 AdBMP-7/BMSC, AdBMP-2를 형질도입 시킨 사람 골수기질세포는 AdBMP-2/BMSC, AdLacZ를 형질도입 시킨 사람 골수기질세포는 AdLacZ/BMSC로, 아무것도 처리하지 않은 사람 골수기질세포는 Mock/BMSC로 표기하였다.

4. Alkaline phosphatase 조직화학 염색

AdBMP를 형질도입 시킨 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포에서 활성형 BMP가 발현되는지 alkaline phosphatase 염색을 실시하였다. 사람 섬유아세포를 AdBMP-2와 AdBMP-7로 형질 도입 시킨 후 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 수확한 후 원심분리 하였다. 상층액을 2% FBS가 포함된 DMEM 배양액과 1:1 비율로 섞은 후 생쥐 근육모세포(C2C12)에 처리하였다. 72시간 후 alkaline phosphatase 염색을 실시하였다. 사람 골수기질세포로 AdBMP-2와 AdBMP-7, AdLacZ를 형질도입 시킨 후, 72시간 동안 배양하고 염색을 실시하였다.

염색은 Sigma alkaline phosphatase kit(No. 85)를 사용하여 시행하였다. 세포를 PBS에 세

척하고 2% paraformaldehyde로 실온에서 30분 동안 고정시켰다. Sodium nitrite 용액과 naphthol AS-BI 알칼리 용액의 혼합물을 넣고, red violet LB salt를 처리한 후, 암실에서 15~30분 동안 반응시켰다. 염색정도는 육안 또는 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 수술 과정

AdBMP를 형질도입 시킨 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포를 면역결핍 생쥐의 척추 옆 근육으로 주입하기 위하여 각 세포를 trypsin-EDTA 용액으로 수확하고 DMEM 배지에 1×10^6 cells/ $25 \mu\text{l}$ 로 분산하였다. 면역결핍 생쥐를 에테르로 마취시킨 후, 등이 위쪽으로 오도록 눕히고(prone position), 수술용 칼을 이용해서 생쥐의 등 한 가운데를 피부와 척추 근막을 따라 5 cm 정도 절개하였다. 흉추 왼쪽 옆 근육에는 아무것도 처리하지 않은 세포(mock)를, 흉추 오른쪽 옆 근육에는 AdBMP-2를 형질도입 시킨 세포, 요추 왼쪽 근육에는 AdLacZ를 형질도입 시킨 세포, 요추 오른쪽

근육에는 AdBMP-7을 형질도입 시킨 세포를 각 1×10^6 cells/site 으로 주사하였다(Fig. 1). 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포를 각각 5마리의 면역결핍 생쥐의 척추 옆 근육에 주사하였다. 피부를 봉합한 후 상처가 아물 때까지 매일 Betadine 용액으로 소독하였다.

6. 방사선 사진 촬영

AdBMP를 형질 도입 시킨 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포를 척추 옆 근육으로 주입한 후 4주와 7주째에 방사선 사진 촬영을 하였다.

7. 조직학적 분석(Masson's trichrome staining)

AdBMP를 형질도입 시킨 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포로부터 뼈가 생성되었는지, 척추 유합이 제대로 일어났는지 확인하기 위하여 조직화학 염색을 실시하였다. 세포를 주입한 후, 4주와 7주에, 생쥐를 희생시키고 척추만 잘라내어 10% formaldehyde 용액에 2일 동안 고정시켰다. 고정된 척추를 물로 세척하고, 5% 질산에서 24시간 동안 탈회시킨 후, 탄산칼슘(CaCO_3) 용액에서 24시간 동안 중화시켰다. 척추 절편을 물로 5시간동안 세척한 후, 탈수, 파라핀 침투과정을 거쳐 파라핀 조직을 만들었다. 파라핀 조직을 -40°C 에서 동결시키고, 조직절단기로 $40 \mu\text{m}$ 간격으로 절단해 들어가면서 조직 슬라이드를 만들었다. 5시간 동안 건조시킨 후, Masson's trichrome 염색을 하였다. 뼈 형성 및 척추 유합 정도는 현미경으로 관찰하였다.

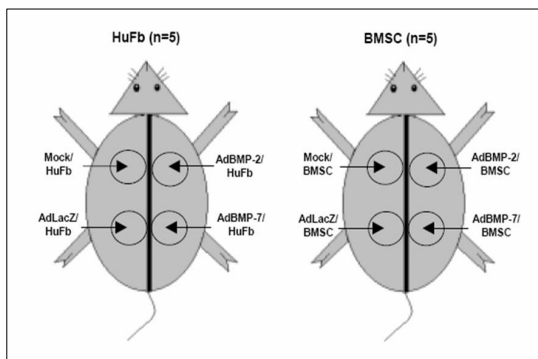


Fig. 1. The region where was injected by AdBMP-2 or AdBMP-7 transduced cells. Five mice in each group were used in this study. HuFb, Human fibroblast; BMSC, Human bone marrow stromal cells.

결 과

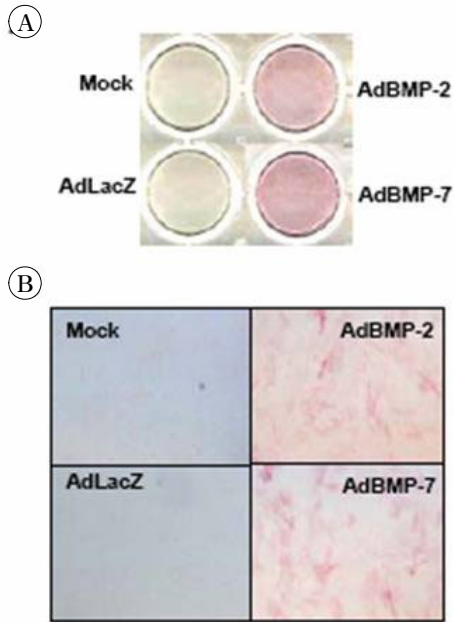


Fig. 2. Alkaline phosphatase activity staining of AdBMP-transduced HuFbs.

(A) observation by naked eye,

(B) microscopic observation (x100).

Mock: untreated cells, AdLacZ: AdLacZ transduced cells, AdBMP-2: AdBMP-2 transduced cells, AdBMP-7: AdBMP-7 transduced cells.

1. AdBMP-2/HuFb와 AdBMP-7/HuFb에서 활성형 BMP 분비

활성형 골 형성 단백질을 근육모세포(C2C12)에 처리하면 alkaline phosphatase 활성이 증가하면서 골 형성이 유도되는 것으로 잘 알려져 있다.³⁰⁾ 따라서 AdBMP-2/HuFb와 AdBMP-7/HuFb에서 활성형 BMP-2와 BMP-7이 분비되는 것을 확인하기 위해서 각각의 섬유아세포 배양액을 쥐의 근육모세포(C2C12)에 처리한 후, alkaline phosphatase 염색을 시행하였다. 그 결과 AdBMP-2/HuFb와 AdBMP-7/HuFb 배양액을 처리한 쥐의 근육모세포에서 붉은 색으로 염색되는 alkaline phosphatase 활성을 관

찰할 수 있었다. 그러나 AdLacZ/HuFb 또는 Mock/HuFb의 배양액을 처리한 쥐의 근육모세포에서는 alkaline phosphatase 활성이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

2. AdBMP-2/BMSC와 AdBMP-7/BMSC에서 활성형 BMP 분비

사람 섬유아세포와는 달리 사람 골수기질세포는 자연적으로 골모세포로 분화하는 세포이다. 따라서 AdBMP를 형질도입 시킨 후, 5일째 직접 alkaline phosphatase 염색을 시행하였다. 그 결과 AdLacZ/BMSC와 Mock/BMSC에서도 alkaline phosphatase 활성이 약하게 관찰되었으나, AdBMP-2/BMSC와 AdBMP-7/BMSC

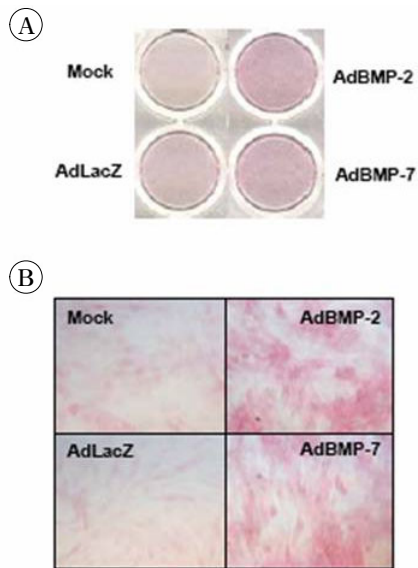


Fig. 3. Alkaline phosphatase activity staining of AdBMP-transduced BMSCs.

(A) observation by naked eye,

(B) microscopic observation (x100).

Mock: untreated cells, AdLacZ: AdLacZ transduced cells, AdBMP-2: AdBMP-2 transduced cells, AdBMP-7: AdBMP-7 transduced cells.

에서 alkaline phosphatase 활성이 더 증가되었다(Fig. 3).

3. 방사선 사진 촬영 결과

AdBMP를 형질도입 시킨 세포를 척추 옆 근육으로 주입한 후, 뼈가 생성되었는지 그리고 척추 유합이 일어났는지 알아보기 위하여, 수술 후 4주와 7주째에 방사선 사진을 촬영하였다. 세포 주입 후 4주째에 검사한 2마리의 생쥐 모두에서 AdBMP-7/BMSC를 주입한 부위에 X-선 사진상에 방사선이 투과하지 않은, 뼈로 추정되는 뚜렷한 영상을 관찰하였다. 그러나 AdBMP-2/BMSC, AdLacZ/BMSC, Mock/BMSC를 주입한 부위에서는 뼈로 추정되는 영상을 관찰할 수 없었다(Fig. 4A, 4B). 그리고 AdBMP를 형질도입 시킨 사람 섬유아세포를 주입한 척추 옆 근육에서는 어느 부분에서도 뼈로 추정되는 뚜렷한 영상을 관찰할 수 없었다. 세포 주입 후 7주째에 검사한 3마리 중 2마리에서 AdBMP-7/BMSC를 주입한 부위에서 뼈로 추정되는 영상을 관찰할 수 있었고, AdBMP-2/BMSC를 주입한 부위에서는 3마리 중 1마리에서만 뼈로 추정되는 영상을 관찰할 수 있었다(Fig. 4C, 4D). 그러나 4주째와 마찬가지로 AdLacZ/BMSC와 Mock/BMSC를 주입한 부위에서는 뼈 형성이 관찰되지 않았다. 사람 섬유아세포를 주입한 생쥐에서는 어떤 부위에서도 뼈로 추정되는 영상을 관찰할 수 없었다.

4. 조직화학 염색(Masson's trichrome staining)

방사선 사진 촬영 결과 뼈로 추정되는 영상이 실제 새로 형성된 뼈인지, 그리고 새로 형성된 뼈에 의해 척추 유합이 일어났는지 확인하기 위하여 쥐들을 희생시킨 후 척추를 적출하여

조직표본을 제작하였다. 조직표본을 Masson's trichrome 염색하여 뼈 형성과 척추 유합을 조사하였다. 시술 후 4주째 희생시킨 생쥐 2마리 모두에서 방사선 촬영결과와 동일하게 AdBMP-7/BMSC를 주입한 부위에 trichrome 염색에서 파란색으로 염색되는 새로운 뼈 조직이 형성되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 1번 생쥐에

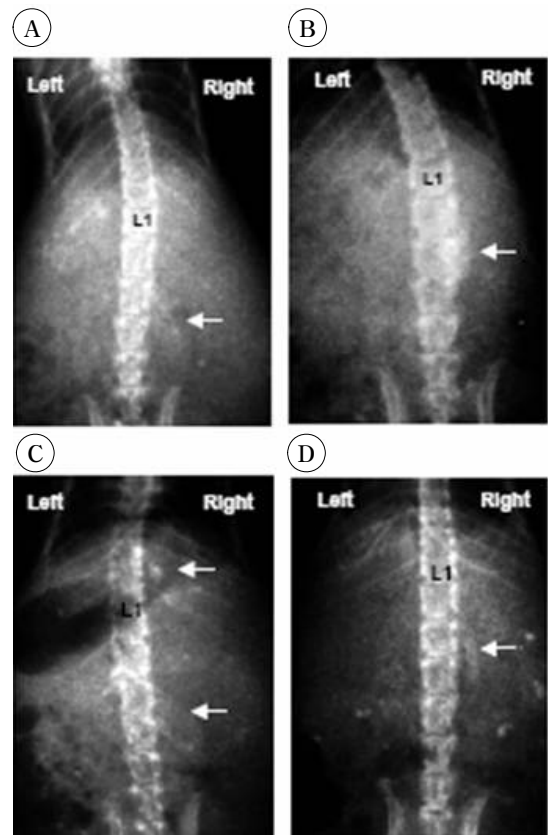


Fig. 4. Radiographic analysis for ectopic bone formation. AdBMP transduced BMSCs were injected into the paravertebral muscles and ectopic bone formation was examined by radiography in 4 and 7 weeks.

(A) 4 weeks, mouse No.1, (B) 4 weeks, mouse No.2, (C) 7 weeks, mouse No.3, (D) 7 weeks, mouse No.4, L1: the first lumbar vertebrae. Arrows indicate radio-opaque density implicating ectopic bone formation.

서는 새로 형성된 뼈 조직이 3번 요추와 장골과 연결되어 있었으며(Fig. 5A), 2번 생쥐의 경우는 새로운 뼈 조직이 2번 요추와 5번 요추와 연결되어 있었다(Fig. 5B). 따라서 2번 생쥐에서는 AdBMP-7/BMSC 주입에 의해 새로운 뼈가 형성되면서 척추 유합이 성공적으로 일어났음을 확인하였다. 그러나 4주째에 조사한 2마리 모두에서 AdBMP-7/BMSC 이외에 AdBMP-2/

BMSC, AdLacZ/BMSC, Mock/BMSC를 주입한 부위에서는 새로운 뼈 형성을 관찰할 수 없었다. 시술 후 7주째 희생시켜 검사한 생쥐 3마리에서는 3마리 모두에서 AdBMP-7/BMSC를 주입한 부위에 새로운 뼈 조직이 형성되었음을 확인하였다. 그리고 한 마리의 생쥐에서 AdBMP-2/BMSC를 주입한 부위에 역시 새로운 뼈 조직이 형성되었다. 3번 생쥐는 AdBMP-7/

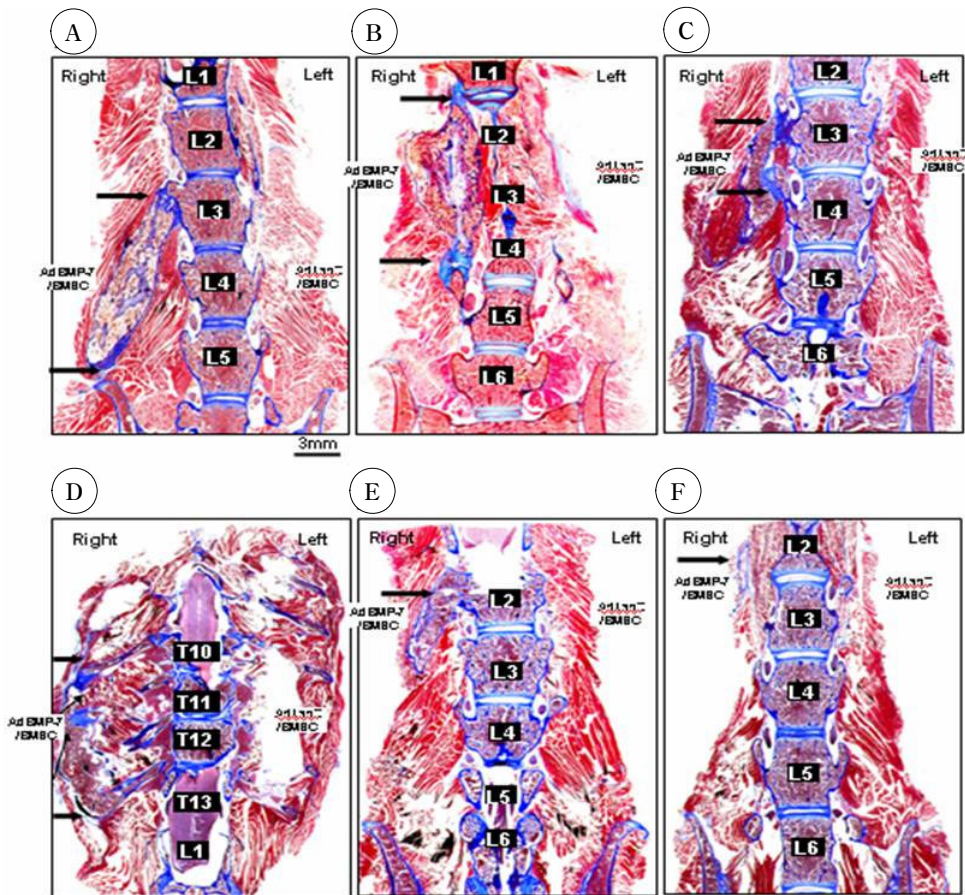


Fig. 5. Histochemical analysis for ectopic bone formation and spinal fusion in mice. Tissue sections of the vertebrae were analyzed by Masson's trichrome staining. (A) mouse No.1 (4 weeks), (B) mouse No.2 (4 weeks), (C) mouse No.3 (7 weeks, lumbar vertebrae), (D) mouse No.3 (7 weeks, thoracic vertebrae), (E) mouse No.4 (7 weeks), (F) mouse No.5 (7 weeks), T: thoracic vertebrae, L: lumbar vertebrae. Arrows indicate ectopic bone formation or spinal fusion.

BMSC를 주사한 부위에서는 3번 요추와 4번 요추 사이에서(Fig. 5C), AdBMP-2/BMSC를 주사한 부위에서는 12번 흉추와 13번 흉추 사이에서(Fig. 5D) 척추 유합을 확인하였다. 4번 생쥐는 2번 요추에서 새로운 뼈 조직이 형성되었으나 척추 유합은 일어나지 않았다(Fig. 5E). 5번 생쥐는 방사선 촬영에서 뼈로 추정되는 영상이 관찰되지 않았으나, 조직 염색결과 척추 옆 근육에 새로운 뼈가 형성되었음을 확인하였다(Fig. 5F). AdBMP/BMSC에 의한 뼈 형성 및 척추 유합에 대한 결과는 Table 1에 요약하였다.

고 찰

이 연구에서는 재조합 BMP-2, BMP-7 아데노바이러스 유전자 치료제를 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포로 형질 도입시킨 후, 면역 결핍 생쥐의 척추 옆 근육으로 주입하여, 새로운 뼈 형성과 척추 유합을 유도하고자 하였다. 이 연구를 통해 동물의 척추 유합 모델에서 사람 섬유아세포를 사람 골수기질세포처럼 척추 유합에 유용한 생체 외 유전자 치료에

활용할 수 있는지, 그리고 척추 유합에 있어 골 형성 단백질-2와 -7 중 어느 것이 더 효과적인지 규명하고자 하였다.

BMP-2와 BMP-7에 관하여 임상적 안정성을 서로 비교한 연구는 있지만,³¹⁾ 직접적으로 BMP-2와 BMP-7의 골 형성능을 비교한 연구나, 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포의 골 형성능의 차이를 비교한 연구는 아직 보고되어 있지 않다. 이 연구에서 사람 골수기질세포를 이용한 경우, AdBMP-2는 5마리 중 한 마리에서만 뼈 형성과 척추 유합이 일어난 반면, AdBMP-7은 5마리 모두에서 뼈 형성이 관찰되었으며, 이중 2마리에서 척추 유합이 일어났음을 확인하였다. 이러한 결과로부터 AdBMP-7이 AdBMP-2보다 골 형성능이 우수한 것으로 판단되었다. alkaline phosphatase 활성 염색 결과 AdBMP-2와 AdBMP-7을 형질 도입한 세포에서 비슷한 정도로 alkaline phosphatase 활성이 유도되는 것으로 보아(Fig. 3), 분비되는 활성형 BMP의 양은 크게 차이가 없는 것으로 추정된다. 결국 두 BMP에 의한 뼈 형성 및 척추 유합 정도의 차이는 두 BMP의 골 형성능의 차이 때문에 생긴 것으로 추정된다. 그러

Table 1. Bone formation and spinal fusion in AdBMP-2 or AdBMP-7 transducing human bone marrow stromal cells

생쥐번호	주입한 세포	AdBMP-7*/BMSC†		AdBMP-2‡ /BMSC		확인한 주
		뼈 형성	척추 유합	뼈 형성	척추 유합	
1		+	-	-	-	4
2		+	+	-	-	4
3		+	+	+	+	7
4		+	-	-	-	7
5		+	-	-	-	7

* : recombinant bone morphogenetic proteins-7 adenovirus

† : bone marrow stromal cells

‡ : recombinant bone morphogenetic proteins-2 adenovirus

나 이 연구에서 AdBMP-2를 형질도입 시킨 세포들은 생쥐의 흉추 옆 근육에, AdBMP-7를 형질도입 시킨 세포는 요추 옆 근육으로 각각 주사하였다(Fig. 1). 요추 옆 근육이 흉추 옆 근육에 비해 근육량이 많아 주입된 세포가 착상하기 쉬운 면이 있는데 이 점 역시 AdBMP-2와 AdBMP-7의 뼈 형성능과 척추 유합 정도에 영향을 미친 것으로 생각되며, 앞으로 동일 부위에 각각 주사하여 뼈 형성 정도 및 척추 유합 정도를 비교 하여야 할 것으로 생각된다.

사람 섬유아세포는 5마리 모두에서 뼈 형성이 관찰되지 않은 반면, 사람 골수기질세포는 5마리 모두에서 뼈 형성을 관찰할 수 있었다(Table 1). 따라서 사람 골수기질세포가 섬유아세포에 비해 골 형성 및 척추 유합에 더 효과적인 것으로 생각된다. 이러한 결과는 골 형성 단백질에 의해서 세포 분화 단계가 변하는 사람 섬유아세포에 비해서 자연적으로 골모세포로 분화될 수 있는 사람 골수기질세포가 골 형성 단백질에 의해서 골모세포로 더 효과적으로 분화되었기 때문으로 생각된다. 사람 섬유아세포가 골수기질세포에 비해 쉽게 분리 배양할 수 있는 이점은 있으나 상대적으로 골 형성능이 떨어지므로 척추 유합에 이용하기에는 부적절한 것으로 생각되지만, 섬유아세포를 활용한 연구는 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

AdBMP-7/BMSC에 의해서 새로 형성된 뼈 부분을 고 배율의 현미경으로 관찰한 결과, 세포 주입 후 4 주째에 비해 7 주째의 형성된 뼈에서는 뼈의 바깥쪽의 치밀골과 안쪽의 골수세포들이 뚜렷하게 나타난 것으로 보아 성숙한 뼈가 형성된 것으로 생각된다. 그러나 실제 형성된 뼈로 인해 척추 유합이 유도되었지만, 새로 형성된 뼈의 물리적 특성이나 척추 유합의

강도에 대해서는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 AdBMP를 형질도입 시킨 세포를 직접 동물의 척추 옆 근육으로 주사하였기 때문에 척추 옆 근육에서는 새로운 뼈가 형성되었지만, 척추 유합이 완전히 유도된 경우는 5마리 중 2 마리에 불과하였다. 이러한 결과로부터 단순히 세포를 주사기로 주입하는 경우, 원하는 부위에 뼈 형성이나 척추 유합을 유도하는 데는 문제점이 있는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구과정을 통하여 개발된 AdBMP-7/BMSC를 세라믹이나 교원질, 키토산, 키틴 등과 같은 생체 적합성 지지체와 결합시켜^{15, 26, 32-35)} 이용한다면 정확한 위치에서 보다 확실하게 척추 유합을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

이상의 결과로부터 AdBMP-7/BMSC는 척추 유합 뿐만 아니라, 뼈 형성 및 재생이 필요한 근 골격계 질환의 치료에 폭 넓게 응용할 수 있을 것으로 생각하며, 앞으로 재생의학 연구에 기여할 것으로 생각한다.

요 약

AdBMP-2와 AdBMP-7을 형질도입 시킨 사람 섬유아세포와 사람 골수기질세포를 면역결핍 생쥐의 척추 옆 근육으로 주입하여 척추 유합을 유도한 결과, AdBMP-7/BMSC가 AdBMP-2/BMSC 또는 AdBMP-7/HuFb와 AdBMP-2/HuFb 보다 골 형성능이 우수하였으며, 척추 유합을 잘 유도하였음을 확인하였다.

감사의 글

* 본 논문의 요지는 2004년도 제29회 전국 대

학생 학술연구 발표대회에서 발표되었음.

* 본 논문은 2004년도 영남대학 의과대학의 학생연구비의 지원을 받아 이루어졌음.

참 고 문 헌

1. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1998 Dec 16;242(4885): 1528-34.
2. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000 Jan;142(1):9-21.
3. 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.
4. Alden TD, Varady P, Kallmes DF, Jane JA Jr, Helm GA. Bone morphogenetic protein gene therapy. *Spine* 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1): S87-93.
5. Lou J, Xu F, Merkel K, Manske P. Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Orthop Res* 1999 Jan;17(1):43-50.
6. Luk KD, Chen Y, Cheung KM, Kung HF, Lu WW, Leong JC. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-4 gene therapy for in vivo bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Aug 29;308(3): 636-45.
7. Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 1999 Jun;24(6): 541-7.
8. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Iizuka T, Miyatake SI. In vitro and in vivo studies of a bone morphogenetic protein-2 expressing adenoviral vector. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1(Pt2):S99-104.
9. Rundle CH, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Chen ST, Sheng MH, Wergedal JE, et al. In vivo bone formation in fracture repair induced by direct retroviral-based gene therapy with bone morphogenetic protein-4. *Bone* 2003 Jun; 32(6):591-601.
10. Alden TD, Pittman DD, Hankins GR et al. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 1999 Sep 1;10(13):2245-53.
11. Cheng SL, Lou J, Wright NM, Lai C-F, Avioli LV, Riew KD. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene. *Calcif Tissue Int* 2001 Feb;68(2):87-94.
12. 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.
13. Lee JY, Peng H, Usas A, Musgrave D, Cummins J, Pelinkovic D, et al. Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. *Hum Gene Ther* 2002 Jul 1;13(10):1201-11.
14. Alden TD, Beres EJ, Laurent JS, Engh JA, Das S, London SD, et al. The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. *J Craniofac Surg* 2000 Jan;11(1):24-30.
15. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge

- for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997 Feb;17(1): 11-25.
16. Boyne PJ. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1(Pt2):S146-50.
 17. Bonadio J, Cunningham ML. Genetic approaches to craniofacial tissue repair. *Ann N Y Acad Sci* 2002 Jun;961:48-57.
 18. Chang SC, Chuang H, Chen YR, Yang LC, Chen JK, Mardini S, et al. Cranial repair using BMP-2 gene engineered bone marrow stromal cells. *J Surg Res* 2004 Jun 1;119(1):85-91.
 19. Djapic T, Kusec V, Jelic M, Vukicevic S, Pecina M. Compressed homologous cancellous bone and bone morphogenetic protein (BMP)-7 or bone marrow accelerate healing of long-bone critical defects. *Int Orthop* 2003;27(6):326-30.
 20. Kuhn DA, Moreland Ms. Complications following iliac crest bone grafting. *Clin Orthop Relat Res* 1986 Aug;(209):224-6.
 21. Alden TD, Pittman DD, Hankins GR, Beres EJ, Engh JA, Das S, et al. Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy. *J Neurosurg* 1999 Jan;90(1 Suppl): 109-14.
 22. Hidaka C, Goshi K, Rawlins B, Boachie-Adjei O, Crystal RG. Enhancement of spine fusion using combined gene therapy and tissue engineering BMP-7-expressing bone marrow cells and allograft bone. *Spine* 2003 Sep 15; 28(18):2049-57.
 23. Jenis LG, Wheeler D, Parazin SJ, Connolly RJ. The effect of osteogenic protein-1 in instrumented and noninstrumented posterolateral fusion in rabbits. *Spine* 2002 May-Jun;27(3): 173-8.
 24. Laurent JJ, Webb KM, Beres EJ, McGee K, Li J, van Rietbergen B, et al. The use of bone morphogenetic protein-6 gene therapy for percutaneous spinal fusion in rabbits. *J Neurosurg Spine* 2004 Jul;11(1):90-4.
 25. Liao SS, Guan K, Cui FZ, Shi SS, Sun TS. Lumbar spinal fusion with a mineralized collagen matrix and rhBMP-2 in a rabbit model. *Spine* 2003 Sep 1;28(17):1954-60.
 26. Kai T, Shao-qing G, Geng-ting D. In vivo evaluation of bone marrow stromal-derived osteoblasts-porous calcium phosphate ceramic composites as bone graft substitute for lumbar intervertebral spinal fusion. *Spine* 2003 Aug; 28(15):1653-8.
 27. Vaccaro AR, Anderson DG, Toth CA. Recombinant human osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) as an osteoinductive agent in spinal fusion. *Spine* 2002 Aug 15;27 (16 suppl 1):S59-65.
 28. Wang JC, Kanim LE, Yoo S, Campbell PA, Berk AJ, Lieberman JR. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats. *J Bone Joint Surg Am* 2003 May;85-A(5):905-11.
 29. Rutherford RB, Moalli M, Franceschi RT, Wang D, Gu K, Krebsbach PH. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue Eng* 2002 Jul;8(3):441-52.
 30. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Iizuka T, Miyatake SI. Expression of bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector in C2C12 myoblasts induces differentiation in to the osteoblast lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 Sep 7;262(3):739-43.
 31. Poynton AR, Lane JM. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine* 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1): S40-8.
 32. Kostopoulos L, Lioubavina N, Karring T,

- Uraguchi R. Role of chitin beads in the formation of jaw bone by guided tissue regeneration. An experiment in the rat. Clin Oral Implants Res. 2001 Aug;12(4):325-31.
33. Partridge K, Yang X, Clarke NM, Okubo Y, Bessho K, Sebald W, et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. Biochem Biophys Res Commun 2002 Mar 22;292(1):144-52.
34. Seol YJ, Lee JY, Park YJ, Lee YM, Young-Ku, Rhyu IC, et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. Biotechnol Lett 2004 Jul;26(13):1037-41.
35. Yoshikawa T, Ohgushi H. Autogenous cultured bone graft-bone reconstruction using tissue engineering approach. Ann Chir Gynaecol 1999; 88(3):186-92.