

조직공학적 인공연골

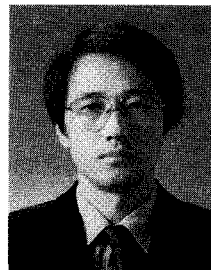
강 길 선 · 이 진 호 · 이 해 방

1. 개 요

연골조직은 인체중에서도 아주 독특한 조직으로써 혈관이 없고, 신경 또한 없으며 또한 재생이 잘 일어나지 않는다는 점이 특징이다. 사고 또는 연골 및 연골하뼈조직의 괴사 등에 의한 질병은 매우 보편적인 것 중의 하나로써 미국의 경우에는 연골조직의 필요건수가 연간 100만건이 상회하는 것으로 나타나고 있다(그림 1, 2).¹ 이들 질병을 고칠 목적으로 지난 100여년부터 구체적인 임상이 실시되었으나 아직까지도 완벽한 치료법이 없는 것은 사실이다. 이의 근본적인 원인은 성별, 나이별, 인종별, 병변부위별, 병변크기, 병변깊이, 병변체적, 병변표면적 및 병변종류에 따라 치료되는 연골의 치료이력이 모두 다르기 때문이다.

이러한 연골치료법은 병변부위의 연골세포의 재생산과 세포체외기질 (extracellular matrix, ECM)의 분비 촉진으로 대부분 수행되고 있다. 이는 연골하뼈까지 절삭, 천공 등의 수행, 상처난 연골표면의

하중을 재분포, 골막 또는 연골막 등으로 상처부위의 표면을 치료, 연골화를 촉진시키는 성장인자의 투여, 자가연골을 체외에서 배양하여 상처부위에 넣는 방법, 일정한 cytokine을 투여하면 연골세포로 변화하는 간(幹, mesenchymal stem cell, chondroprogenitor cell) 세포의 투여방법 등으로 많은 발전이 거듭되고 있다.² 최근에는 연골세포 또는 幹세포를 생분해성 고분자와 결합하는 이른바 조직공학적 인공연골에 다다르게 되어 Carticell[®]이라는 상표로 미국의 식품의약안전청에서 허가를 받아서 Genzyme



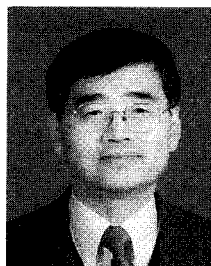
이진호

1979 한양대학교 화학공학과(학사)
1981 서울대학교 화학공학과(석사)
1982~ KIST 고분자재료연구실 연구원
1984
1984~ 유타대학교 재료공학과(박사)
1988
1988~ 한국화학연구소 생체의료고분자연구실 선임연구원
1993
1993~ 한남대학교 고분자공학과 부교수
현재



강길선

1977~ 인하대학교 고분자공학과(학사)
1981
1981~ 인하대학교 고분자공학과(석사)
1985
1987~ 한국화학연구소 생체의료고분자팀, 선임연구원
1998
1991~ 아이오와 주립대학교 생체의료공학과(박사)
1995
1998~ 전북대학교 고분자공학과 전임강사
현재



이해방

1964 동국대학교 화학과(학사)
1966 동국대학교 화학과(석사)
1974 유타대학교 재료공학과(박사)
1974~ Univ. of North Carolina 치과대학 선임연구원
1976
1975~ Milton Roy사, Lord사, Kendall사 책임연구원
1984
1984~ 한국화학연구소 책임연구원
현재

Artificial Cartilage by Tissue Engineering

전북대학교 고분자공학과(Gilson Khang, Dept. of Polymer Sci. & Tech., Chonbuk Nat'l Univ.)

한남대학교 고분자공학과(Jin Ho Lee, Dept. of Polymer Sci. & Eng., Hannam Univ.)

한국화학연구소 생체의료 고분자팀(Hai Bang Lee, Biomaterials Lab., KRICT)

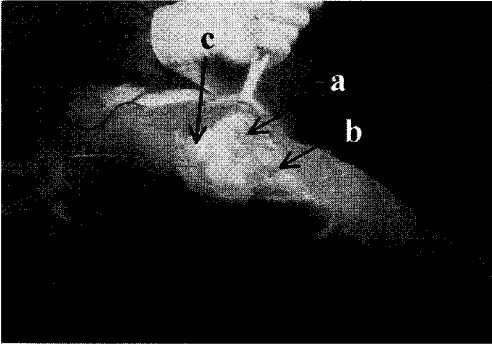


그림 1. 무릎 연골질환의 대표적인 질환으로 뼈와 연골 부분의 괴사로 인한 무릎 중앙부분에 직경 1.2 cm 정도 크기의 상처로 인하여 (화살표 a) 보행에 막대한 지장이 있다. 이러한 경우에는 본인의 골막 (화살표 b)과 관절 경으로 떼어낸 자가증식 연골세포 (화살표 c)로 치유하게 되는데 완전한 치유에 약 1~1년 6개월 정도가 소요된다.



그림 2. 선천성 섬유연골의 기형으로 귀가 비정상적으로 왜소하게 된 경우. 후천적인 기형의 경우에는 레슬링 선수들의 모양이 변한 귀들을 들 수 있다.

Tissue Repair사에 의해서 판매되기에 이르렀다.³⁻²¹

본고에서는 연골의 해부학적 고찰, 연골세포의 특징, 연골세포의 분리방법,幹세포에서 연골세포로 분화하는 과정, 분리된 연골세포를 이용하여 조직공학 적 장기를 만드는 제조기술 등을 고찰하고자 한다.

2. 연골의 해부학적 고찰²²

2.1 연골

연골은 발생하는 과정을 제외하면, 대부분의 경우에서 관절의 일부를 이루고 있다. 움직임이 비교적 적게 필요한 경우, 골과 골 사이를 연골로 연결하는

연골 관절 형태를 보인다. 한편, 많은 운동이 필요한 경우에는 두 개의 연골면이 활액을 사이에 두고 접촉하는 활막관절을 덮고 있는 관절연골의 마찰계수가 매우 낮아서, 마찰이 거의 없이 움직일 수 있다는 사실에 기인한다. 연골은 연골세포, 섬유질기질로 구성된다.

2.2 성분 및 분자론적 구조

연골에서 연골로서의 틀을 유지하게 하는 섬유질은 콜라겐으로 구성되어 있다. 기질은 연골에 높은 탄력성을 부여하여, 연골로 하여금 압력과 장력 등에 잘 견딜 수 있게 하는 역할을 한다. 기질은 주로 단백질 다당으로 구성되어 있다고 한다. 단백질 다당은 한 개의 줄로 된 주쇄 단백질에 여러 개의 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG)이 붙어서 만들어진다. 대표적인 GAG에는 황산콘드로이틴과 황산케라틴 등이 있다. 단백질 다당은 보통 10개 내지 30개가 모여서 거대한 분자를 형성한다. 거대 분자의 형성은 다당 단백질이 결합 단백질에 의해, 하이아루론산 및 이와 비슷한 분자에 연결되면서 형성된다. 이들 거대 분자는 교원 섬유 사이의 공간에 위치하며, 이중 1/3 가량은 교원 섬유에 단단히 부착되어 있다(그림 3).

2.3 연골세포(Chondrocyte)

연골로 변환될 모체(blastema)는 세포가 증식함에 따라, 간엽 조직 세포들의 단위 면적당 수가 늘어나서 치밀한 구조를 이룬다. 모체의 내부에 있는 세포는 차츰 호염성을 나타내는데, 이러한 세포를 연골 모세포(chondroblast)라 한다. 연골 모세포는 교원 섬유와 기질을 형성하는바, 중심부에 있는 세포가 계속해서 더 많은 기질을 형성함에 따라, 연골 모세포들이 서로 분리되면서 연골세포로 된다.

연골세포는 소강(lacunae)속에 들어 있으며, 다량의 지방질과 글리코젠을 함유하고 있다. 연골세포와 소강은 연골내에서 그들의 존재하는 위치에 따라 모양이 변화한다. 연골하막에 있는 연골세포는 그 장축이 표면에 평행하도록, 즉 섬유모세포와 같이 평평하게 배열된다. 연골 심층에 있는 세포와 그의 소강은 일반적으로 둥근 형태로 되어 있다.

2.4 분류 및 구조

연골은 그것을 형성하는 섬유질의 성질과 모양에 따라, 초자 연골, 탄성 연골 및 섬유 연골로 나뉜다.

2.4.1 초자연골(Hyaline Cartilage)

신체에 가장 널리 분포하는 연골로서 관절연골(articular cartilage)이 대표적이며 유리연골이라고

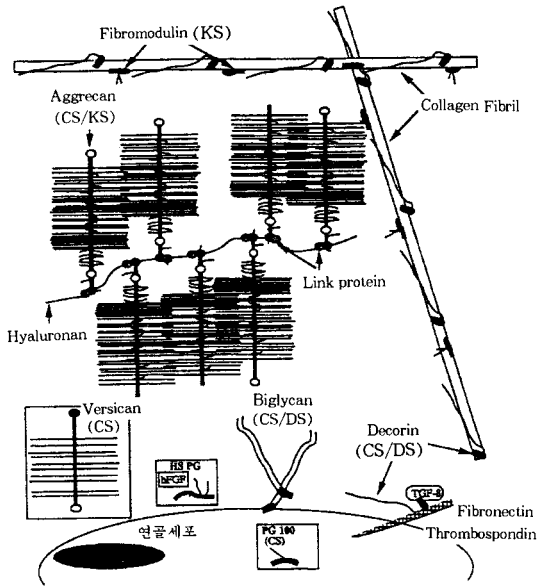


그림 3. 연골의 단백 다당의 기능과 연골세포와 다른 세포의 기질과의 관계를 설명한 그림. KS : 황산케라틴, CS : 황산콘드로이틴, DS : 황산더미탄, TGF- β : 변환성장인자- β , bFGF : 기본 섬유아세포 성장인자.

도 한다. 늑 연골, 비 연골, 후두 연골 및 기관지 연골 등이 이에 속한다. 태아에서 연골내 골화는 초자연골로 되어 있다가, 골화에 의하여 골로 대체된다.

관절연골은 관절 표면에 연하여 있는 표재층, 그 밑에 있는 중간층, 심층 및 석회층의 네 층으로 나눌 수 있다(그림 4). 소아에서는 관절연골의 중간층에서 세포 분열을 볼 수 있으며, 성인이 되면 심층은 골단판과 같이 소실되어 망상골이 된다.

2.4.2 탄성연골(Elastic Cartilage)

탄성연골은, 외이, 이관, 후두개 등에서 볼 수 있으며, 세포 간질내에 많은 탄성 섬유를 포함하고 있다. 탄성 섬유는 간질내에 탄성망을 이룬다. 이것은 초자연골보다 황색을 띠며, 불투명하고 탄력성이 더욱 크다.

2.4.3 섬유연골(Fibrous Cartilage)

섬유연골은 인대나 건이 관절 인접부에 부착하는 장소, 추간판, 원형 인대 등에서 볼 수 있다. 간질이 밀집한 교원 섬유는 서로 평행하게 배열되어 있으며 그들 사이에 연골세포가 열을 짓고 있다. 연골막은 존재하지 않는다. 섬유연골은 섬유 조직과 초자연골의 중간 단계로 이해될 수 있다.

2.4.4 골단판(Epiphyseal Plate, Physis)

골단판은 성장판이라고도 하며, 성장이 완료될 때

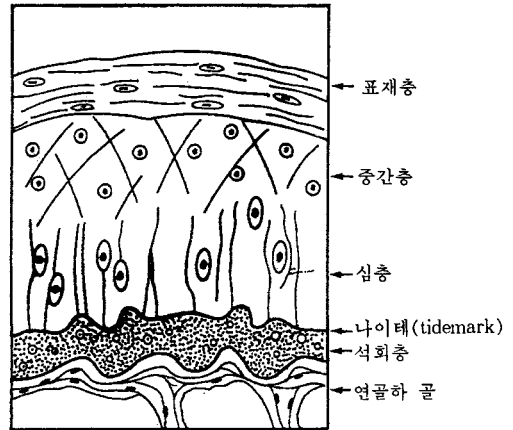


그림 4. 관절연골의 배열.

까지 존재하고 성장의 완료와 함께 소실되어 완전히 골질로 연결될 부분이다. 골단판은 이차 골화 중심에 의해 형성된 골단(epiphysis)과 일차 골화 중심에 의해 형성된 골간단(metaphysis) 사이에 위치하는 연골이며, 관골의 길이를 성장시키는 중요한 역할을 한다.

골단판은 조직학적으로 정지대(resting zone), 증식대(proliferating zone), 성숙대(maturing zone), 잠정 석회화대(provisional calcification zone)의 네 층으로 나뉜다(그림 5). 정지대는 골단에 가장 가까운 부분으로 여기에는 미성숙한 연골세포가 있으며, 이 세포들은 단일 혹은 쌍을 이루고 있다. 증식대는 연골세포의 세포 분열이 왕성하고, 세포는 동전을 쌓아 놓은 것처럼 배열되어 있으며, 산소 분압이 가장 높고, 방사선 조사에 가장 영향을 많이 받는 부위이다. 성숙대의 연골세포는 계속 비대해지고, 마지막에는 변성을 일으켜, 그 주위에 석회화가 일어나는 잠정 석회화대로 이행하게 된다. 성숙대는 외력에 가장 약한 부위로 알려져 있다.

2.5 생리 및 기능

연골은 그 변형 및 파괴강도가 비교적 크고, 탄성 역시 높아, 마치 고무 같은 물성을 가지고 있다(그림 6).² 연골에 주어지는 장력에 대한 저항력은 주로 콜라겐에 의한 것으로 나타나며, 관절연골에의 하중 부하와 같은 압축력은 콜라겐에 어느 정도 붙어 있으면서 기질내에 수분의 양과 흐름을 조절하는 단백질 다당의 작용에서 비롯되는 부분이 많다. 특히 관절연골의 가장 바깥 부분에 있는 정지대는 전달력에 강하다(그림 7).²

연골에는 혈관과 림프관이 없으므로, 영양 공급은

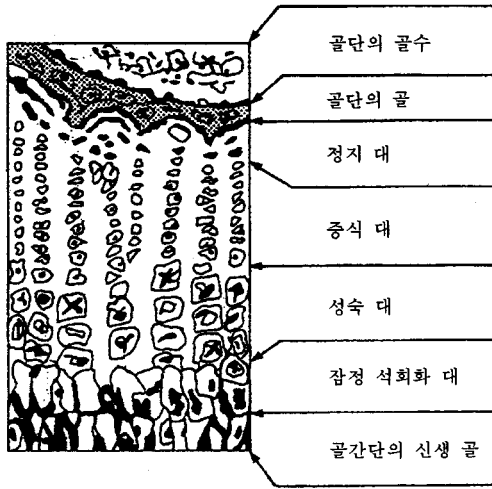


그림 5. 골단판의 구조.

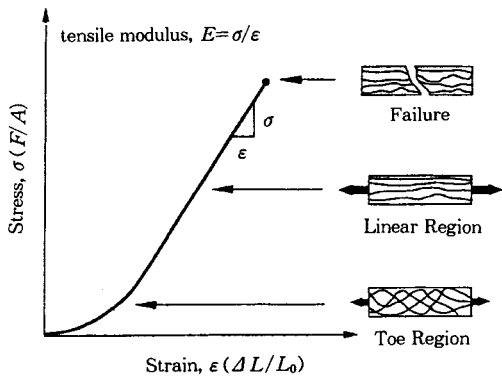


그림 6. 연골의 인장강도 시험시 S-S 특성 curve. 일반 합성 고분자와는 달리 "toe 영역"이 존재하는데 이 이유는 무질서하게 흐트러져 있는 콜라겐 섬유소 때문인 것으로 기인된다.

완전히 확산에 의해 이루어진다. 그리하여 노쇠한 연골이나 두께가 매우 두터운 연골에서는 영양 공급이 불충분하여 변성되고, 이어 퇴행성 변화로 진행된다. 퇴행성 변화에서 연골의 심층은 유연해지고 액화됨으로서 결국 강이 형성되게 된다. 시간이 경과함에 따라, 연골은 투명도가 낮아지고, 점차 청백색을 잃어 불투명한 황색으로 되며, 탄성도 감소하게 된다. 이러한 변화는 산성 뮤코 다당질의 감소와 비교적 단백질(non-collagenous protein)의 증가에 기인된다. 연골의 석회화는 연골내 골화의 정상적인 과정이지만, 노쇠한 연골에서도 비정상적으로 나타날 수 있다.

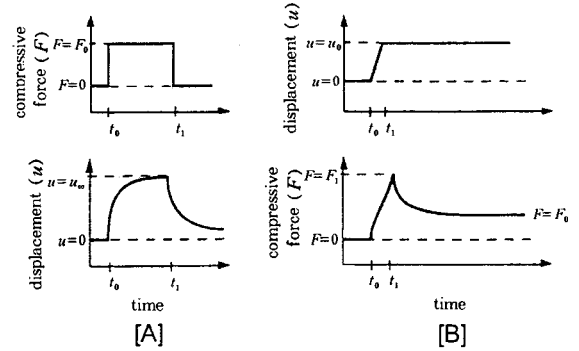


그림 7. 연골이 압축강도에 대한 점탄성 특성 curve는 일반합성 고분자의 그것과 똑같다. [A] 시간 t_0 에 압축력이 가해지면 크리프현상이 고찰되고, 이 힘이 t_1 에 제거되면 다시 $u=0$ 로 회복된다. [B] 표면 외에 일정한 힘의 압축력을 계속 증가시키면서 u_1 까지 가하여 계속 유지시키면 $F=F_0$ 로 일정한 변형이 유지되는 이른바 이완 현상이 관찰된다.

3. 연골세포의 분리 및 배양

3.1 연골세포의 분리

일반적으로¹¹ 세포를 분리하는 방법은 효소분리법, 기계적 분리법, 조직배양법 등이 있다. 효소분리법은 트립신, 콜라게네이즈, 프로네이즈, 디파아제와 같은 효소를 사용하여 조직으로부터 세포를 분리하는 방법으로 연골세포, 골아세포, 피부세포, 각막세포, 신장세포 등을 분리하는데 쓰이고 있다. 조직으로부터 기계적으로 세포를 분리하는 방법은 혈관내피세포와 방광이행상피세포 등을 분리하는데 주로 쓰이며, 평활근세포 또는 골모세포를 분리할 때 쓰이는 방법으로는 조직배양법이 쓰이고 있다. 연골세포의 분리의 경우에는 대부분 효소분리법을 사용하는데 대략적인 방법은 다음과 같다.

생후 2~4주된 송아지의 상지 관절에서 연골을 얻는 경우에는 우선 베타딘과 알콜 등으로 전체를 소독한 뒤 세포배양 후드안으로 송아지 상지를 옮겨 무균 상태에서 관절을 노출시킨다. 수술용 칼을 사용하여 연골 조직을 분리하여 채취한 다음 PP 튜브에 옮긴다(그림 8). 이때 연골 바로 밑에 위치한 뼈 조직이 포함되지 않도록 조심하여야 한다. 채취된 연골 조직은 5% 페니실린-스텝토마이신이 함유된 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척 후 0.3% type II 콜라게네이즈가 포함된 F-12 배양액에 넣고 37 °C 세포배양 인큐베이터내에서 약 8~10시간을

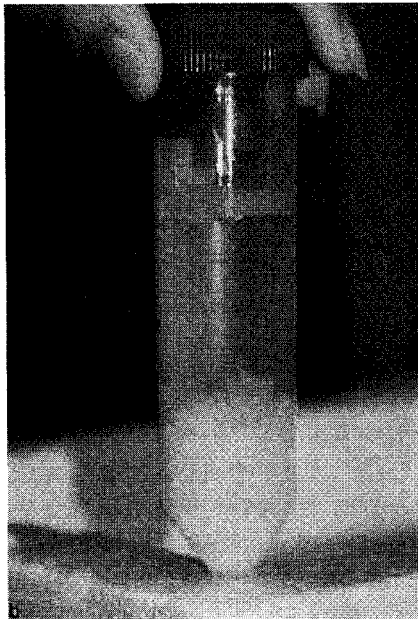
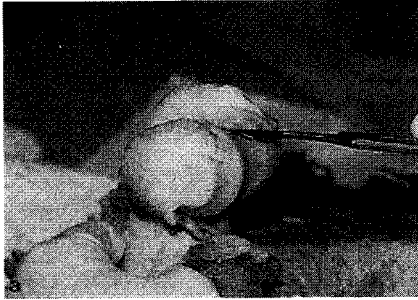


그림 8. 소의 관절에서 연골 조직의 채취과정.

흔들면서 용해시킨다. 연골조직의 덩어리가 보이지 않을 정도로 용해되었을 때 약 100 μm 크기 구멍을 가진 나일론 필터를 사용하여 용해되지 않은 연골 조직을 걸러낸 후 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상층액을 제거하여 PBS로 3회 세척한다. 용해되어 분리된 세포는 계수하고 비타민 C, 항생제와 10%의 혈장이 포함된 F-12 배양액을 첨가하여 연골세포를 배양 접시에 나누어 배양하였다.

사람의 경우에는 관절경의 통하여 떼어낸 연골 조직을 위와 같은 방법으로 연골세포를 분리한다.

3.2 연골세포의 배양

세포배양에 필수적인 것은 세포에 맞는 배양조건을 맞추어 주는 것이다. 체외에서는 배양되는 세포들은 종류에 따라 배양 조건이 다르며, 시판되고 있는 배양액 또한 무수히 많다. 건강한 세포의 배양을 위해서는 배양액 이외에 혈청 및 필요한 성장 인자

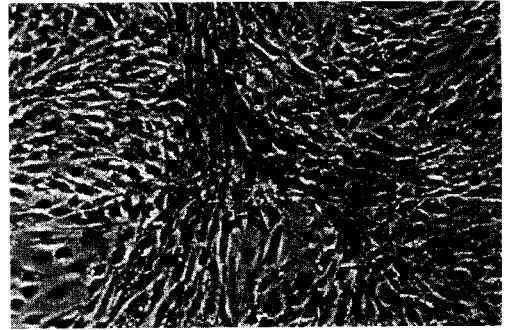


그림 9. 체외에서 대량배양된 소의 연골세포 (toluidine blue 염색, $\times 100$).

를 추가로 첨가하는 경우가 많다. 연골세포의 배양에 필요한 배양액은 F-12, DMEM 또는 F-12/DMEM 혼합배지가 사용되는데, 500 mL당 10% 송아지 태아에서 얻은 혈청과 25 mg의 비타민 C, 항생제를 혼합한다. 정기적으로 3일 간격으로 배양액을 교체하고 7~10일에 한 번씩 1:5의 비율로 계대 배양을 시행한다. 세포의 대량 배양은 생체조직공학의 응용에 있어 기본적으로 필요하다. 대량 배양의 방법으로는 회전병, cell factory, 중공사모 들방법 등이 있다.

배양된 전체 세포중 연골세포가 차지하는 비율과 연골세포의 성장확인을 하는 것이 중요하다. 연골세포를 확인하기 위한 방법들은 aldehyde fuschin alcian blue, toluidine blue, 또는 safranin-o 염색이 있으며 이들은 연골세포가 분비하는 기질을 염색하여 성장 확인하는 방법들이다(그림 9).

3.3 연골세포 성장속도

조직공학을 이용한 인공연골의 개발시에 특히 사람에게 적용되는 경우에는 다량의 세포가 필수적이다. 가장 손쉬운 방법은 전술한 바와 같이 관절경을 통한 관절연골(초자연골)의 채취 또는 귀에서 귀연골세포(섬유연골)를 미량 취하여 콜라게네이즈로 ECM을 분해한 후, 순수한 연골세포를 분리하여 대량배양을 수행하여야 한다. 그러나 분리된 사람의 연골세포의 성장속도는 젊은 연령이라고 하더라도 원하는 만큼은 얻기가 어려우며 또한 계대배양의 회수의 증가에 따라서도 현저히 감소되며 또한 이러한 차이는 성별, 연령, 상치부위의 병변 종류에 따라서도 성장속도가 많은 차이가 있다.²³ 일례로 대부분 퇴행성 관절염을 앓고 있는 고연령층의 분리된 연골세포의 배양은 아주 더딘 것으로 알려져 있어 젊은

연령층의 연골세포에 비교해볼 때 *in vitro* 에서의 배양은 힘든 것으로 알려져 있다.

더구나 가장 큰 문제점은 관절연골의 경우에는 대부분이 하중에 잘 견딜 수 있는 초자연골로 구성되어 있는데 초자연골세포의 경우 *in vitro* 내에서 1달 동안 배양하면 대부분이 섬유 연골로 변환된다는 점이다. 따라서 초자연골세포의 배양의 경우에는 사람의 상태와 거의 유사하게 환경을 만들어 주어야만 된다. 예를 들면 static 배양보다는 dynamic 배양을, 배양액내 산소의 분압을 낮추고, 500~1,000 psi의 압력을 가하는 배양이, 그리고 배양액이 흐르는(flow) 상태에서의 배양이 본격적으로 수행되고 있다.

4. 조직공학적인공연골의 최근 연구동향

4.1 연골세포만의 이식 경우

연골세포의 복원에 가장 많이 이용되고 있는 방법으로는 자가연골을 관절경으로 채취하여 연골세포를 분리하고 이를 체외에서 1개월정도 배양하여 골막 및 연골막과 같이 이용하여 치료하는 방법이었으나, **그림 10**에는 똑같은 방법으로 시술한 토끼의 조직학적 소견으로써 이식된 초자연골의 복원이 4주부터 일어나서 26주차에는 patellar groove defects나 femoral condyle의 복원에 있어 거의 원래의 것과 외견상의 조직학적인 차이가 없음으로 보여주었다.² 48주 후에도 역시 정상연골과 복원된 연골사이엔 차이점은 없이 나타났다. 그러나 외견상의 조직학적 소견으로는 이상이 없어도 원래 연골조직과의 접합 부분이 완전히 못함을 알 수 있다. 복원된 연골표면이 높은 하중을 견디기 위해서는 본래 연골주위와의 완전한 결합이 필요하다.

4.2 조직공학적인공연골

따라서 위의 경우에서와 같이 연골세포를 체내에서 성장시켜 연골조직의 복원에 있어 사람의 경우에는 시술 후 2~4주 동안은 견지 못하며 완전복원에는 약 1년~1년 6개월이 소요되며 위의 예와 같이 완전복원에는 아직도 의문사항이 많은 것은 사실이다. 따라서 이러한 단점을 개량하고자 연골세포와 생분해성 고분자를 결합하는 이른바 조직공학적 연골기법이 1988년에 처음 시도되었다.¹¹

이 실험은 분리된 연골세포를 시험관에서 직경 15 μ m 생분해성 부직포 담체에 심을 것으로써 연골

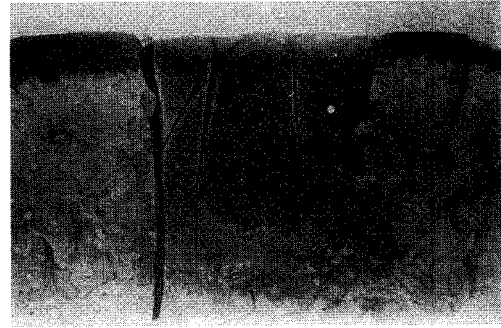


그림 10. 4주째된 New Zealand 실험용 토끼에서 분리된 연골을 이용하여 자가로 이식되어 26주 후에 상처가 복원된 조직학적 소견(H & E 염색, $\times 25$). 상처부분을 완전히 복원되었으나 원래 연골 조직의 접합 부분이 완전히 못함을 알 수 있다. 복원된 연골표면이 높은 하중을 견디기 위해서는 본래 연골 주위와의 완전한 결합이 필요하다.



그림 11. PGA 생분해성 부직포에 파종된 인공연골의 전자현미경 사진. 부직포섬유에 연골세포가 부착되어 증식이 잘 되고 있음을 보여 주며 ECM의 분비도 왕성함을 보여준다. 세포조직공학의 성공적이고 대표적인 사례로 사람의 귀 및 코형태를 얻은 실험용 쥐의 사진과 함께 유명한 사진중의 하나이다.

세포는 신생 송아지의 관절연골을 채취하여 무균환경하에서 효소를 이용하여 세포질과 세포를 분리하여 세포만을 채취한 다음, 생분해성 고분자 담체에 심어주게 되는데 이때 사용된 담체는 PGA(현재 생체 흡수성 봉합사로 사용됨) 부직포로 만들어 생체 내에서 완전히 분해되고 생체에 해가 없도록 적합하게 만들어 졌다. 그 다음 $10^7 \sim 10^9$ cells/mL의 각기 다른 세포현탁액을 고분자 담체에 심어준 다음 배양기에 넣어 둔다. 세포는 고분자를 따라 증식을 하며 ECM을 분비하는 것으로 나타났다(**그림 11**).

이때 *in vitro*에서 생분해성 고분자 담체에 연골세포의 성장을 최적화 하여야 하는데 중요한 인자가

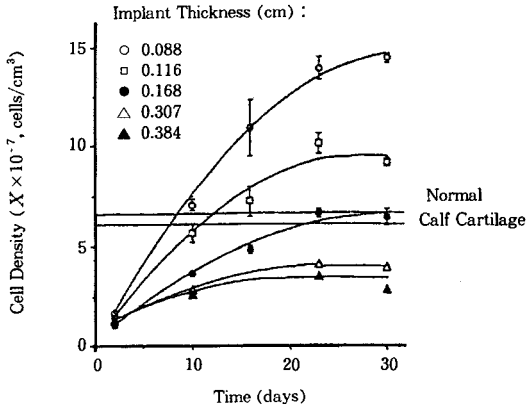


그림 12. PGA 담체 두께에 따른 연골세포 밀도의 변화.

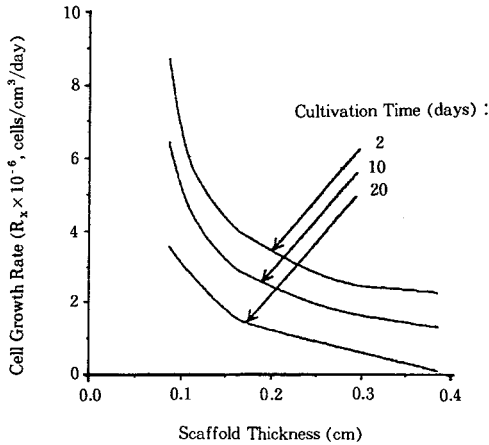


그림 13. PGA 담체 두께에 따른 세포성장속도의 영향.

과중세포밀도, 고분자 담체의 두께 및 배양조건 등이다.²⁴ 그림 12에는 PGA 담체의 두께에 따른 세포의 밀도로서 얇으면 얇을수록 좋게 나타내고 있음을 보여준다. 또한 그림 13에는 PGA 담체 두께에 다른 세포의 성장속도를 나타낸 것으로서 역시 동일함을 보이고 있으며 이는 분비된 ECM에 있어서 콜라겐과 GAG 양에서도 동일함이 관찰된다(그림 14). 그림 15에는 배양상태 즉, 정적상태의 배양상태와 동적배양과 정적배양이 혼합된 경우에 세포의 밀도를 나타낸 것으로서 사람의 보행상태와 똑같은 즉 동적배양의 경우에 세포밀도가 일반 연골농도 이상으로 나타냄으로써 세포배양조건 역시 중요함을 일깨워주고 있다. 실제적인 경우에는 분리된 초자연골이 정적배양에 있어 대부분 섬유연골로 변환되는 것이 관찰되어 환자로 부터 분리된 연골세포 대량배양

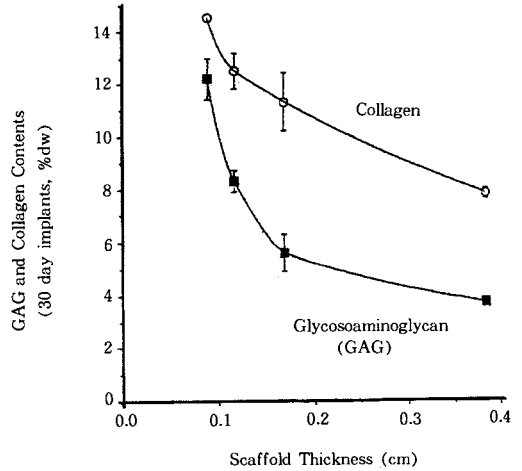


그림 14. PGA 담체의 두께에 따른 GAG와 collagen의 생성의 영향.

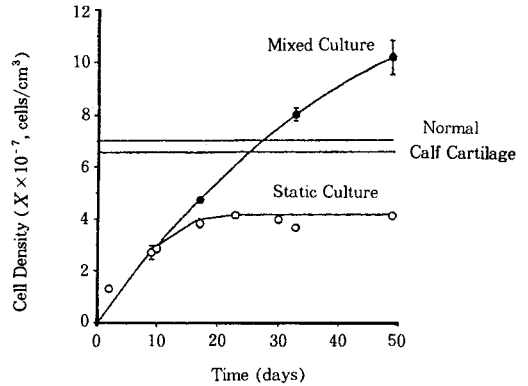


그림 15. 연골세포의 배양시 정적(static)과 동적 및 정적이 혼합된(mixed) 배양에 있어 세포밀도의 영향. 동적 배양을 수행하는 경우가 세포밀도가 높음을 보여 인체내의 환경과 유사하게 만들어 줄수록 좋음을 보이고 있다.

에 있어 동적배양이 될 수 있는 생물반응기의 선택이 필수적이다.²⁵ 따라서, 조직공학적인 인공연골의 연구시에는 선택된 세포-담체시스템의 최적조건 연구가 필히 수행되어야 한다.

4.3 골수(Bone Marrow Stromal, Stem, 간(幹)) 세포와 조직공학을 이용한 인공연골의 재건

전술한 바와 같이 연골세포의 *in vitro* 배양은 어렵고, 또한 초자연골은 섬유연골로 전환이 빠르다. 더구나 퇴행성 관절염의 경우에는 노령화된 세포이기 때문에 연골세포의 대량배양이 아주 어렵다. 따라서 최근에는 간세포의 대량배양후 *in vitro*에서 특정 cytokine을 이용하여 연골 및 뼈세포로 전환시켜 조직공학에 사용하는 이른바 “stem cell engi-

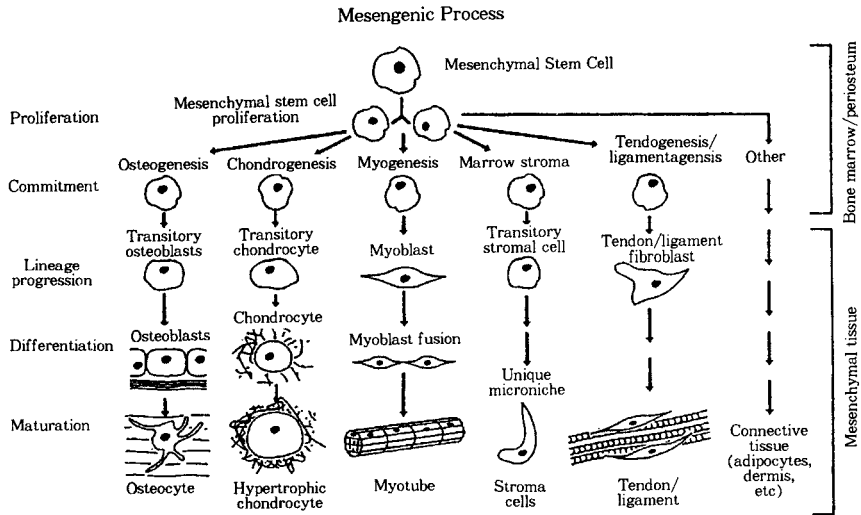


그림 16. 간세포에서부터 분화되는 모든 세포들. 최근 이들 간세포를 대량 배양하여 원하는 특정세포로 변환시켜 원하는 장기에 사용하는 이른바 "stem cell engineering (간세포공학)"이라고 하는 연구가 널리 수행중이다.

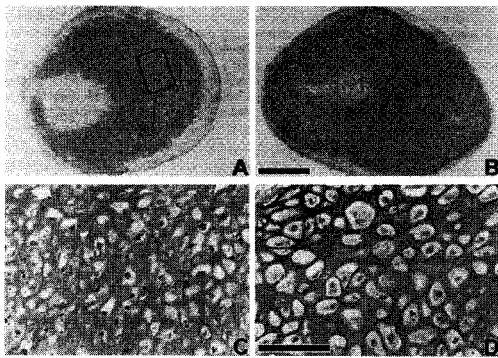


그림 17. 대량배양되어 여러 가지 cytokine으로 인하여 연골세포로 분화되는 과정의 것으로서 펠렛배양 28일째, (A), (C) ; 비성숙화된 연골세포, (B), (D) ; 성숙화된 연골세포, 성숙화된 연골세포를 위하여 1 nM dexamethasone, 50 mg/mL thyroxine, 20 nM의 β -glycerol phosphate가 배양액에 투여되었다.

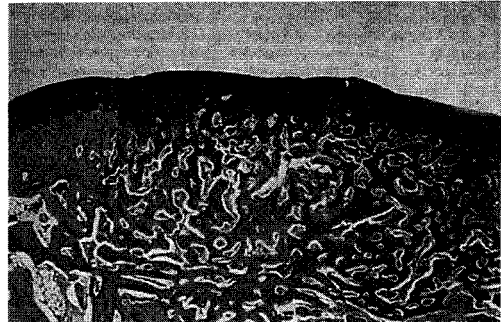


그림 18. 간세포만으로 상처부위가 치료된 관절연골 부분의 조직학적 사진.

neering(간세포 공학)"이라고 하는 개념의 연구가 수행중이다(그림 16).²⁶⁻²⁸ 이 간세포는 인체내의 모든 세포로 이를 테면, 뼈세포, 연골세포, 근육세포, 인대 및 섬유아세포, 지방세포, 적혈구, 백혈구 등 신체에 존재하는 모든 세포로 변환되는 즉, 인체의 재생에 있어서 근간이 되는 중요한 세포이다.

최근에 미국의 한 벤처기업인 Osiris Therapeutics에서는 사람의 간세포에서 연골세포로 분화시키는 과정을 cytokine을 투여함으로써 조절할 수 있다고 최근에 발표하였는데²⁹ 이는 우선 펠렛배양을 수

행하였고 4.5 g/L의 고 글루코스 Dulbecco modified Eagle medium(DMEM) 배양액, 100 nM의 dexamethasone, 10 ng/mL의 transforming growth factor- β_3 (TGF- β_3)을 처음 2주 후에 투여한 후에 TGF- β_3 는 제거하고 50 nM thyroxine과 1 nM의 dexamethasone을 투여하는 방법으로써 거의 완벽하게 연골분화(chondrogenic)한 프로세싱을 발표하였다(그림 17). 뼈의 경우에는 10^{-8} M의 dexamethasone과 50 μ g/mL의 ascorbic acid를 투여함으로써 비교적 쉽게 분화시킬 수 있다.

그림 18에는 간세포만으로 상처부위가 치료된 연골부분의 조직학적 사진으로써 훌륭히 치료됨을 보여주고 있어 간세포와 조직공학적인 결합으로 더 나은 연골의 재생으로 예견할 수 있다.²

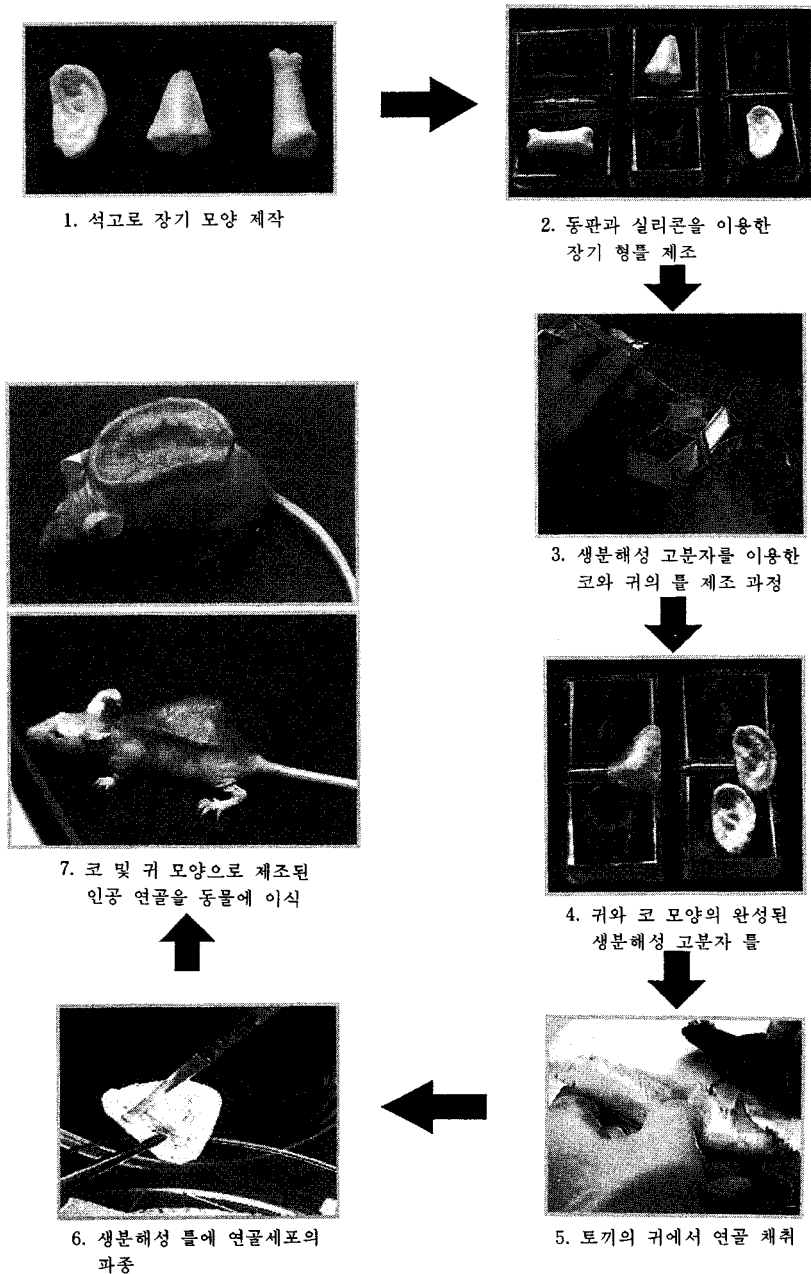


그림 19. 본 연구팀에서 시도된 조직공학을 이용한 귀와 코모양의 인공연골 제조 기법.

4.4 조직공학적 인공연골 재건의 실제예³⁰

기본적인 조직공학의 기법을 본 연구팀에서 시도된 인공연골을 바탕으로 요약해보면 우선 석고로 장기 모양의 형틀을 제조한 후(그림 19.1) 이를 이용하여 동판과 실리콘을 이용하여 장기형틀을 제조한다(그림 19.2). 이를 이용하여 PGA 부직포 생분해성 고분자를 이용하여 코와 귀의 틀을 제조한다(그림 19.3

과 19.4). 한편으로 동물 및 환자의 몸에서 연골세포를 채취하고(그림 19.5) 그 조직편으로부터 세포를 분리한 다음 분리된 세포를 배양을 통하여 필요한 양만큼 증식시키고 생분해성 고분자틀에 심어 일정 기간 체외 배양한 뒤(그림 19.6) 이 세포-고분자 귀 및 코모양 구조물을 다시 체내로 이식한다(그림 19.7). 이식 후의 세포는 신생 혈관이 형성될 때

까지는 체액의 확산에 의해 산소와 영양분을 공급받다가 실험동물내에서 혈관이 자라들어와 혈액의 공급이 이루어지면 세포들은 증식, 분화하여 새로운 조직 및 장기를 형성하고 생분해성 고분자는 자연히 체내에서 분해되어 없어지게 되는 것이다.

5. 결 론

이상과 같이 조직공학적인 인공연골의 개발 및 연구현황을 간단하게 고찰하였다. 앞으로 더욱더 깊게 연구되어야 할 분야는

- (1) 초자연골 배양시 섬유연골로 변하지 않게 하는 동적배양 방법 개발,
- (2) 간세포로부터 대량배양과 이들의 완벽한 chondrogenesis를 일으킬 수 있는 cytokine의 확립과 배양조건 개발,
- (3) 연골의 성장에 가장 적합한 생분해성 담체의 개발,
- (4) 표재층, 중간층, 심층 및 골단판과 같이 사람과 똑같은 연골구조의 개발,
- (5) 동물의 연골실험을 위한 protocol의 개발,
- (6) 사람에게 적용시킬 수 있는 임상기술 개발 등이 계속 연구되어야 한다.

조직공학 기법으로 재생된 연골조직의 응용분야에는 본 연구에서 보여준대로 귀 및 코모양의 재건, 두개골 재건, 기관지 재건, 관절연골의 재생, 성형외과 영역에서의 광대뼈 왜소증, 무턱, 남성성기의 건축 및 확대술, 정형외과 영역에서 고관절, 슬관절, 수부관절, 손가락관절, 손목관절에 이르기까지 무한적으로 응용될 수 있다. 따라서 본 조직공학적인 인공연골의 연구에 있어서는 생화학자, 의학자, 약학자, 고분자공학 등의 재료과학자 및 의사 등의 여러 분야에서 다학제간의 연구가 필수적이고 산·연·학간의 공동연구 또한 필수적이다.

감사의 글: 본 총설중 본 연구자들에 의하여 수행된 연구는 보건복지부(Grant No., HMP-97-E-0016)와 과기부(Grant NO., 97-N1-02-05-A-02)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 291 (1993).
2. V. M. Goldberg and A. I. Caplan, "Cellular Repair of Articular Cartilage", in "Osteoarthritic Disorders", eds. by K. E. Kuettner and V. M. Goldberg, chap. 25, AAOS, 1994.
3. G. Khang and H. B. Lee, *Chem. World*, **37**, 46 (1997).
4. H. B. Lee, "Frontiers of Macromolecular Science", eds. by T. Saegusa, T. Higashimura, and A. Abe, p. 579, Blackwell Scientific Publications, London, 1989.
5. G. Khang, J. H. Lee, and H. B. Lee, "Polymeric Biomaterials", in "Biomedical Engineering Handbook", 2nd Ed., J. D. Bronzino ed., Section IV, chap. 42, CRC Press, Boca Raton, FL., 1999.
6. H. Alexander, *Tissue Engineering*, **1**, 197 (1995).
7. G. Khang and H. B. Lee, *J. Biomed. Eng. Res.*, **20**, 1, 1999.
8. R. P. Lanza, R. Langer, and W. L. Chick eds., "Principles of Tissue Engineering", Academic Press, New York, 1996.
9. A. Atala, D. J. Mooney, J. P. Vacanti, and R. Langer eds., "Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds", Birkhauser, Boston, 1996.
10. E. Bell, "Tissue Engineering: Current Perspectives", Birkhauser, Boston, 1993.
11. J. J. Yoo and I. Lee, "Tissue Engineering: Concepts and Applications", Korea Med. Pub., 1998.
12. A. G. Mikos, *Biomaterials*, **17**, 81 (1996).
13. A. J. Domb, J. Kost, and D. M. Wiseman, "Handbook of Biodegradable Polymers", Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherland, 1997.
14. R. Langer and J. P. Vacanti, *Scientific American*, **273**, 130 (1995).
15. A. G. Mikos and D. J. Mooney, *Scientific American*, **280**, 60 (1999).
16. R. Lanza and W. L. Chick, "Yearbook of Cell and Tissue Transplantation", Kluwer Academic Publisher, Netherland, 1996.
17. R. Shalak and C. F. Fox, "Tissue Engineering", Alan. R. Liss, Inc., New York, 1988.
18. Y. M. Lee, "Tissue Engineering", Hanyang Acad. Pub., 1999.
19. Y. H. Jo, S. K. Park, J. J. Lee, K. S. Oh, Y. N. Park, and B. G. Min, *J. Biomed. Eng. Res.*, **20**, 237 (1999).
20. G. Khang and H. B. Lee, *Bioindustry*, **22**, 32 (1999).
21. U. S. Dept. of Health and Human Service & Public Health Service, Health Resources and Service Administration, Division of Organ Transplantation, Pub. HRS-M-Sp89-1.
22. S. I. Suk, ed., "Orthopedic Surgery", Choishineihaksa Co., 1996.
23. Z. Nevo, D. Kobinson, and N. Halperin, "The Use of Grafts Composed of Cultured Cells for Repair and

- Regeneration of Cartilage Bone", in "Bone; Fracture Repair and Regeneration", p. 123, ed. by B. K. Hall, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
24. L. E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, J. C. Marguis, and R. Langer, *Biotech. Bioeng.*, **43**, 597 (1994).
 25. S. E. Carver and C. A. Heath, *Tissue Engineering*, **5**, 1 (1999).
 26. A. I. Caplan, *J. Orthop. Res.*, **9**, 641 (1991).
 27. A. I. Caplan, *Scientific American*, **251**, 84 (1984).
 28. A. I. Caplan, *Biomaterials*, **11**, 44 (1990).
 29. A. M. Mackay, S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester, and M. F. Pitfenger, *Tissue Engineering*, **4**, 415 (1998).
 30. G. Khang, I. Jo, J. H. Lee, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**, 640 (1999).