

PLLA/HA Composite Scaffold와 골수 줄기세포를 이용한 조직공학적 골재생에 대한 연구

김병렬 · 장현석 · 임재석 · 이의석 · 김동현
고려대학교 의과대학 치과, 구강악안면외과학교실

Abstract

BONE TISSUE ENGINEERING USING PLLA/HA COMPOSITE SCAFFOLD AND BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL

Byeongyol Kim, Hyonseok Jang, Jaesuk Rim,
Euseok Lee, Donghyun Kim

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Medicine, Korea University

Aim of the study: Scaffolds are crucial to tissue engineering/regeneration. Biodegradable polymer/ceramic composite scaffolds can overcome the limitations of conventional ceramic bone substitutes such as brittleness and difficulty in shaping. In this study, poly(L-lactide)/hydroxyapatite(PLLA/HA) composite scaffolds were fabricated for *in vivo* bone tissue engineering.

Material & methods: In this study, PLLA/HA composite microspheres were prepared by double emulsion-solvent evaporation method, and were evaluated *in vivo* bone tissue engineering. Bone marrow mesenchymal stem cell from rat iliac crest was differentiated to osteoblast by adding osteogenic medium, and was mixed with PLLA/HA composite scaffold in fibrin gel and was injected immediately into rat cranial bone critical size defect(CSD:8mm in diameter). At 1, 2, 4, 8 weeks after implantation, histological analysis by H-E staining, histomorphometric analysis and radiographic analysis were done.

Results: BMP-2 loaded PLLA/HA composite scaffolds in fibrin gel delivered with osteoblasts differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells showed rapid and much more bone regeneration in rat cranial bone defects than control group.

Conclusion: This results suggest the feasibility and usefulness of this type of scaffold in bone tissue engineering.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cell, Bone regeneration, Bone tissue engineering, Poly(L-lactide)/hydroxyapatite(PLLA/HA) composite scaffolds

I. 서 론

종양이나 낭종 등의 외과적 적출이나 외상으로 인한 골 결손부의 치유를 위해서는 골 이식 등의 조직 이식을 필요로 하며, 조직 재생은 기능 회복 및 심미적인 관점에서 매우 중

요하다. 질환으로 인한 결손부의 창상 치유기전에 의한 자연적 회복을 기대할 수도 있으나 크기가 광범위한 경우 부가적인 조직 이식이 필요하다. 최근에 와서 줄기세포를 이용한 조직 재생에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 골 결손부의 재생이나 골 이식술 및 임플란트의 치료에 있어서

※ 본 연구는 (주) 유한양행 보건장학회의 지원으로 수행하였음.

골 융합(osseointegration)을 증진시키기 위한 조직 공학적 기법의 적용에 널리 관심을 가지게 되었다. 조직공학 기법을 이용한 골 재생에는 다양한 종류의 scaffold 들이 이용되고 있다. 골조직의 재생에 널리 사용되고 있는 인공적인 polymer scaffold에는 hydroxyapatite(HA)^{1,2)}, polyglycolide(PGA)^{3,4)}, polylactides(PLA)^{5,6)}와 polycaprolactone(PCL)^{7,8)} 등이 있는데 이들은 생체적합성이 우수하고 생분해성을 지니고 있어 우수한 재료로 알려지고 있다. 또한 천연 polymer로 collagen^{9,10)}이나 alginate^{11,12)} 등이 사용되기도 한다. 골재생에 있어서 여러 가지의 polymer들이 사용되는데 흔히 사용되는 polymer는 sponge나 fiber형태로 이용되는 PLA, PGA, PLGA 등이 있다. 이런 생분해성 고분자들은 생체적합성이 좋고, 봉합사 등의 사용에서 보듯이 생체재료로 많이 이용되고 있어 안전성도 입증되었으며, 쉽게 원하는 형태로 제조도 용이하고, 용해되는 시간조절도 가능하며, 성장인자들의 방출정도를 조절할 수 있는 이점이 있다.

일반적으로 생체재료를 이식하면 주변골과의 사이에 apatite layer를 형성함으로 골과 결합하는 것으로 알려져 있고¹³⁾, 생체재료에 의한 골 형성능을 증진시키기 위해 상온에서 simulated body fluid (SBF)에 이식재를 담가두어 apatite coating을 유도하는 방법이 Kokubo 등에 의해 개발되고 그 유용성에 대해 보고되고 있어^{14,15)} 생체재료 표면에서의 apatite의 효과에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. HA 등의 생활성 세라믹은 우수한 골 재생 능력에 비하여 기계적으로 취약하여 그 임상적 응용에 한계가 있으며 polymer 등의 고분자는 골 형성 능력이 세라믹에 비하여 떨어지는 등 생체 특성적인 면에서 개선해야 될 부분이 많은 실정이다. 이에 본 연구에서는 생활성 세라믹과 생체 고분자와의 복합화를 통하여 역학적 생물학적 최적화를 통한 골 조직공학에의 유용성에 대하여 연구하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. PLLA/HA Composite Scaffold Fabrication

PLLA/HA composite scaffold는 Poly(L-lactic acid)(PLLA)(Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Germany, viscosity 1.4-1.8 dl/g)를 이용하여 double emulsion-solvent evaporation 법을 사용하여 제조하였다. HA와 1:1 volume으로 혼합하여 PLLA/HA composite scaffold를 제조하였다. 전자현미경 소견을 관찰하기 위하여 제조된 scaffold를 알루미늄 지지체 상부의 동테이프

에 위치시키고 gold coating을 시행하였다. JSM 6330F(JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하여 주사전자 현미경 소견을 촬영하고 microspher는 ethylene oxide gas 소독을 시행하였다.

2. 줄기세포의 배양 및 골모세포로의 분화

백서의 장골에서 간엽 골수 줄기세포를 채취하여 직경 150mm의 배양접시에 plating 하고 10% FCS, 100U penicillin/ml과 100mg streptomycin/ml(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 함유하고 있는 DMEM(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 5-7일 동안 배양하였다. Confluent 해지면 0.05% Trypsin/EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 직경 100mm의 배양접시에 plating하여 계대배양을 시행하였다. 세포들은 10% FCS, 100U penicillin/ml, 100mg streptomycin/ml, 0.2mM ascorbic acid, 10mM β -glycerophosphate, 0.1 μ M dexamethasone 등의 osteogenic supplement를 함유한 DMEM (Gibco, hg, minus calcium, without L-glutamine and pyruvate, Grand Island, NY, USA)으로 3주간 배양하여 골모세포로의 분화를 유도하였다.

3. 동물실험

체중 250-300g 내외의 백서를 ketamine hydrochloride(8mg/kg body weight, 유한양행, 서울, 대한민국)와 xylazine hydrochloride(1.15 mg/kg body weight, 한국바이엘주식회사, 서울, 대한민국)를 근주하여 마취를 시행하고 두개부의 정중선에 절개를 가하고 8mm trephine drill을 이용하여 8mm 크기의 critical size defect(CSD)를 형성한 다음 장골에서 채취한 줄기세포에서 분화시킨 골모세포와 PLLA/HA scaffold를 혼합하여 이식하고 3-0 black silk를 이용하여 피부를 봉합하였다. 아무런 이식을 시행하지 않은 경우를 대조군으로 하고 실험군은 fibrin glue(Greenplast[®], 녹십자, 서울, 대한민국), PLLA, HA, PLLA/HA만을 각각 이식한 경우와 여기에 골모세포를 혼합하여 이식한 군, 여기에 추가적으로 1 μ g의 rhBMP-2를 혼합하여 이식한 군으로 분류하여 실험을 시행하였다. 각 군당 1, 2, 4, 8주마다 5마리씩의 백서를 연구에 이용하여 총 220마리의 백서를 연구에 이용하였고 골 결손부 당 5 \times 10⁵개의 골모세포를 혼합하여 이식하였으며 100 mg/ml의 fibrinogen sol과 500 IU/ml의 thrombin sol의 fibrin glue를 loading material로 사용하였다.

4. 조직학적 소견의 관찰

실험 1,2,4,8 주 경과 후 실험동물을 희생하여 주위 정상 골을 포함한 이식부를 치과용 드릴을 이용하여 채취하고 생리 식염수로 세척하고 10% neutral buffered formalin 에 고정한 뒤 탈회 및 탈수 과정을 거쳐서 paraffin에 매입한 후 5-6 μ m의 두께로 박절 표본을 만들어 Hematoxylin-Eosin에 중염색하여 조직 표본을 제작하여 신생골 형성을 평가하였다.

5. Soft X-ray & 3D CT Analysis

신생골 형성을 soft x-ray 분석을 위하여 Movix-1000를 이용하여 50 Kvp, 5mA로 촬영하고 디지털 영상을 Photoshop 7.0 프로그램을 이용하여 주위 정상골에 대한 신생골의 상대적인 density 분석을 시행하고 채취된 표본에 대한 3D CT를 촬영하여 신생골 형성을 비교 분석하였으며 그 결과를 Microsoft Excel의 paired t-test를 이용하여 통계처리를 시행하였다. 대조군과 실험군의 1, 2, 4, 8 주 표본을 각군당, 채취 시기별로 3개씩을 분석에 사용하였다.

III. 연구 결과

1. 전자 현미경 소견

Double emulsion-solvent evaporation 법을 사용하여 제조한 PLLA/HA composite scaffold의 전자 현미경 소견에서 PLLA 표면에 hydroxyapatite 결정의 균일한 침착을 보이고 있었다(Fig. 1).

2. 조직학적 소견

조직학적 소견에서 초기 1,2 주에서는 아무런 이식을 시행하지 않거나 fibrin glue 만을 이식한 경우 염증세포의 침윤이 다량 보였으며 4주 경과 후부터 신생골 형성이 관찰되나 8주 경과 후에도 그 양이 미미하였다. 그러나 HA, PLLA 이식군에서는 신생골 형성 속도 및 양이 대조군에 비하여 증가된 양상이었지만 8주 경과 후에도 결손부의 완전한 재생은 관찰되지 않고 있었다. PLLA/HA 이식군에서는 4주 경과 후부터 신생골 형성이 왕성하였고 골모세포를 동시에 투여한 경우와 커다란 차이를 관찰할 수 없었지만 특히 1 μ g의 rhBMP를 동시에 투여한 경우 8주 소견에서 골 결손부가 거의 재생이 완료되고 bone remodeling이 상당히 진행되어 있었다(Fig. 2).

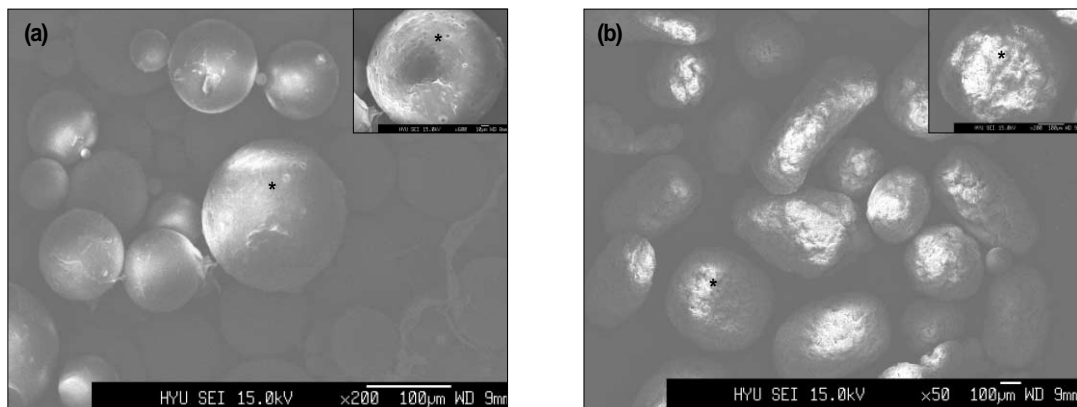


Fig. 1. SEM findings of PLLA/HA composite scaffold. (a: Only PLLA($\times 200$), b: PLLA/HA($\times 50$))

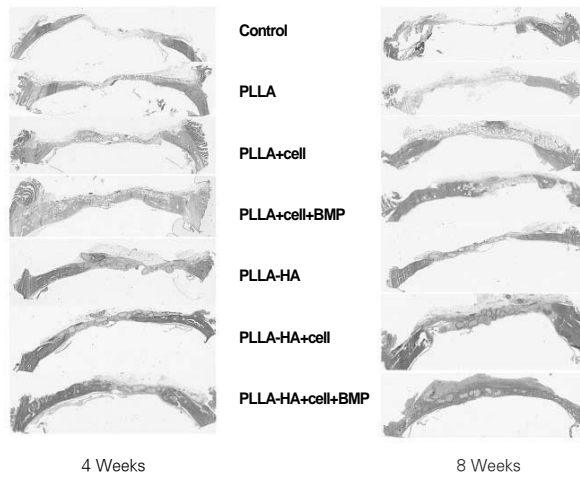


Fig. 2. H&E staining findings.

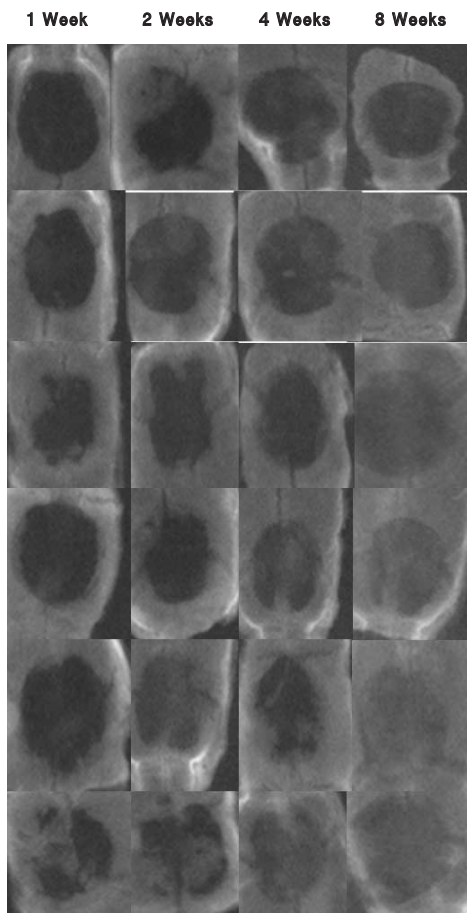


Fig. 3. Soft X-ray findings.

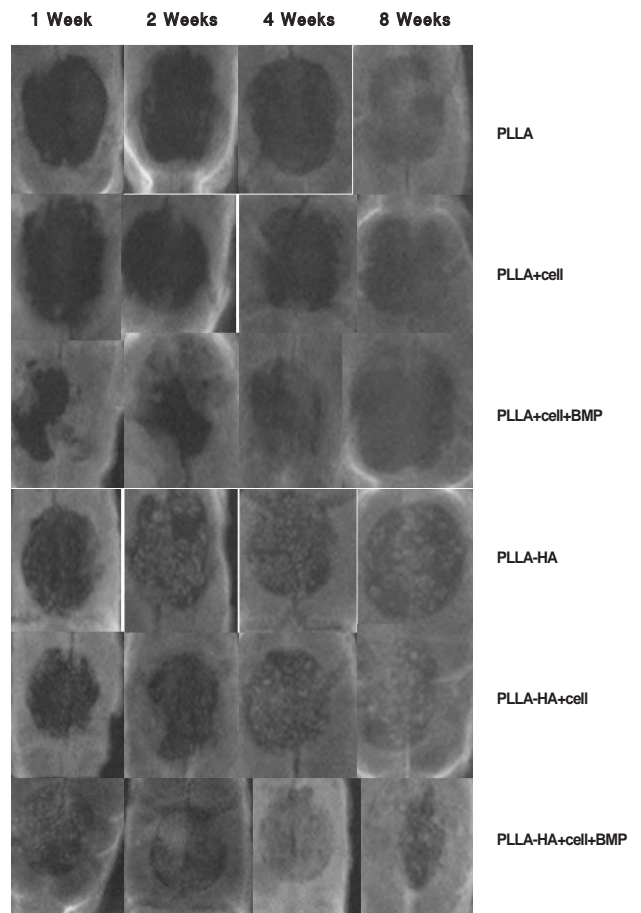


Fig. 4. Soft X-ray findings.

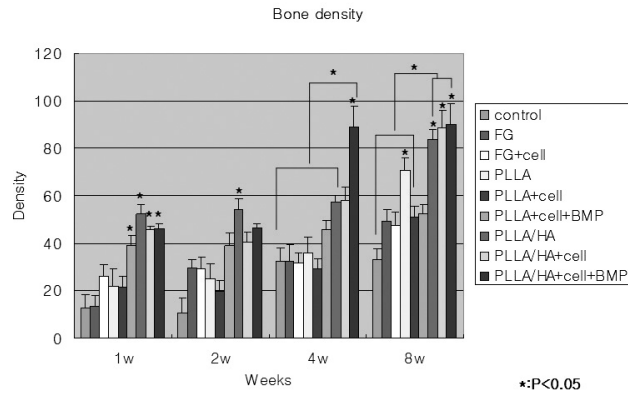


Fig. 5. Result of bone density analysis.

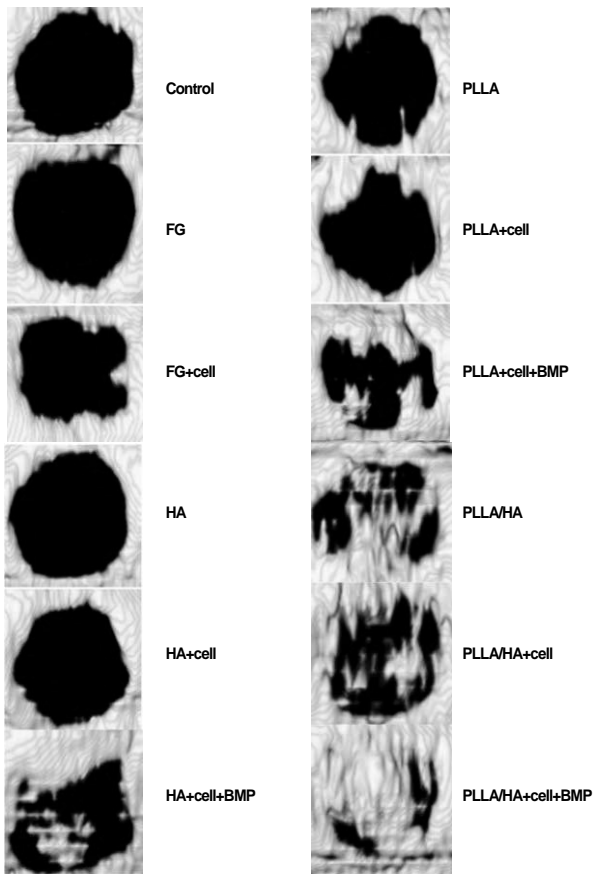


Fig. 6. 3-D CT findings(4 weeks).

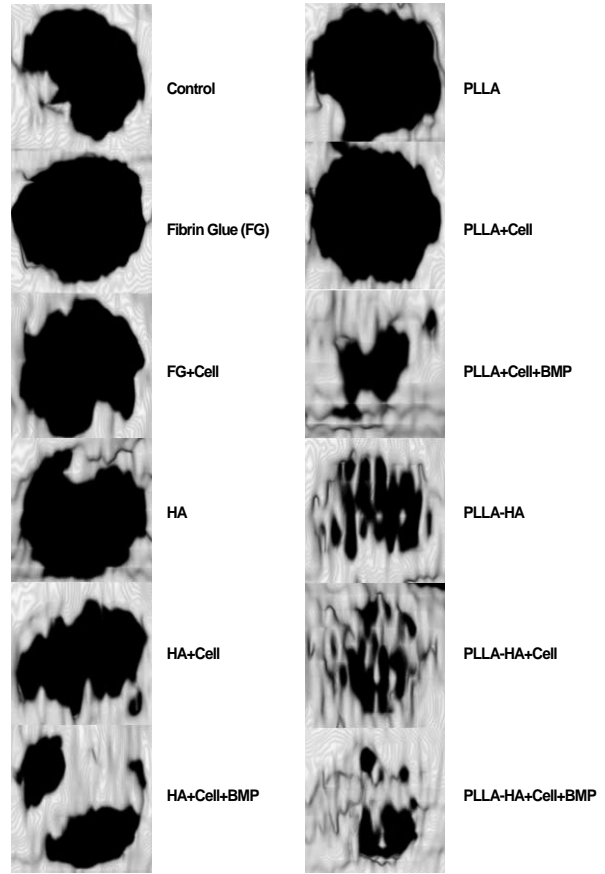


Fig. 7. 3-D CT findings(8 weeks).

3. Soft X-ray

Soft X-ray 소견에서 control group과 fibrin glue만을 투여한 경우 8주 경과 후에도 완전한 골 결손부의 재생이 발생되지 않았으며 PLLA만을 투여한 경우보다 PLLA/HA를 투여한 경우에서 골재생이 많이 진행되고 있었고 여기에 추가하여 골모세포를 투여한 경우 골형성이 증가되어 있었으나 rhBMP가 추가된 경우에 비하여 그 양이나 속도가 감소된 양상이었다. PLLA에 HA를 coating한 경우 초기 1주부터 bone density가 증가되어 있었고 특히 4주 소견에서는 PLLA/HA, 세포 및 BMP를 동시에 사용하였을 때 bone density가 다른 군에 비하여 뚜렷하게 증가되어 있었으나 8주 소견에서는 PLLA/HA만을 투여한 경우나 여기에 세포를 동시에 투여한 경우보다 BMP를 같이 이식한 경우 bone density에서 큰 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 3, 4, 5).

4. 3D CT 소견

조직학적 소견이나 soft X-ray 소견과 유사하게 골재생이 PLLA/HA를 투여한 경우 왕성하였고 특히 BMP를 투여한 경우에는 골 결손부의 재생이 거의 완료되는 양상이었다(Fig. 6, 7).

IV. 총괄 및 고찰

오늘날 각종 사고나 노인성 질환으로 인해 손상된 조직이나 장기를 원래대로 복구하고자 하는 요구는 급증하고 있으며 이에 따라 신약의 개발이나 치료법의 변화와 함께 손상 부위를 인공적으로 대체할 물질, 즉 생체재료의 개발을 통해 재건하고자 하는 많은 노력이 모아지고 있다. 인체의 여러 조직 중에서 뼈와 치아로 대표되는 경조직은 다른 조직과는 확연히 구별되는 물리화학적 생물학적 특성을 지니고 있다.

인체의 골조직은 콜라겐 섬유의 유기질에 아파타이트 결정의 무기질이 일정하게 침착된 복합체로 이러한 독특한 구조로 매우 효과적인 생역학적 기능을 수행한다. 이는 다른 조직과는 달리 세포의 기질이 유기질만으로 이루어진 것이 아니라 무기질을 포함하는 유-무기물 복합체라 할 수 있으며 무기질에는 calcium phosphate인 hydroxy-apatite (HA)가 대부분을 차지하게 된다. 현재까지 골 이식용 재료로 생활성 세라믹과 생체 고분자가 많이 사용되고 있는데 생활성 세라믹은 우수한 골 재생 능력에 비하여 취약한 기계적 물성으로 인해 임상적 응용에 한계를 가지고 있으며 고분자의 경우 골 재생 능력이 생활성 세라믹에 비해 떨어

지는 등 생체 특성 면에서 개선되어야 할 점이 많이 있다. 따라서 생활성 세라믹과 생분해성 고분자의 하이브리드화는 골조직을 모방하는 연구의 시작이라 할 수 있으며 나아가 골의 특성을 인공적으로 재현해낼 수 있는 기술의 출발이라 할 수 있겠다. 생활성 세라믹은 일반적으로 탄성계수가 매우 높으며 충격에 약하기 때문에 탄성계수가 낮으며 충격에도 쉽게 부러지지 않는 고분자 재료와의 융합을 통해 골과 유사한 역학적 물성을 지니게 할 수 있다. 세라믹 분말을 고분자 용액과 혼합하여 고분자의 성질을 고려한 비교적 낮은 온도에서 복합체를 합성하여 세라믹과 고분자의 양 및 종류에 의해 역학적, 생화학적 물성이 조절되며 적절한 혼합비에 의해 골과 유사한 탄성계수와 강도를 얻을 수 있다.

PLLA는 인체 해면골과 유사한 3차원적 다공성 구조를 가지고 있어 골 형성에 유리하며 bonelike mineral을 PLLA에 coating함으로써 기계적 강도를 증가시키고 골전도성을 향상시킬 수 있는 것으로 알려지고 있다¹⁶⁾. 본 연구에서는 macroporous PLLA sheet나 plate가 아닌 PLLA particle을 이용하여 HA와의 composite scaffold를 제조하여 연구에 이용하였다.

한편 대부분의 세포들은 소수성을 띄는 생체재료 표면이나 양전하를 띄는 표면에 더 잘 부착되는데¹⁷⁾, 이는 세포의 부착 단백질(adhesive serum protein)이 음성을 띄고 있어 양성을 띄는 생체재료 표면에 더 강력한 결합을 하는 것으로 추정된다. 연골세포를 이용한 세포부착 연구에서 소수성이거나 음성을 띄는 polymer 표면보다 양성을 나타내는 polymer 표면에서 세포의 증식이 활발한 것으로 알려지고 있다¹⁸⁾. 이는 더 강력한 charge interaction으로 인한 초기 세포 부착량의 증가, 그리고 세포와 생체재료 표면과의 더 강력한 결합으로 배양액의 혼들음으로 생기는 shear stress에도 잘 견디게 되는 것 때문으로 생각된다. 본 연구에서는 연골세포가 아닌 골모세포가 사용되었으나 음성을 나타내는 표면보다 양성을 나타내는 표면에 더 잘 부착하는 세포의 일반적인 특성을 고려한다면 본 연구에서도 같은 추론이 가능하리라 생각된다.

일반적으로 microparticle 형태의 scaffold는 다양한 크기의 주사기로 투여가 가능하고 주입할 때의 shear strength로 인해 microparticle의 변형이 일어나지 않아야 하며 주사 후 타 부위로 이동되지 않아야 하는데¹²⁾ 직경이 40 μ m 이하 이면 혈류를 통하여 다른 부위로 이동될 수 있는 것으로 알려지고 있으며¹⁹⁾ 직경이 20 μ m 이하인 경우에 *in vitro*이었지만 phagocyte가 microparticle을 uptake함으로써 쉽게 다른 부위로 이동될 수 있음이 보고되고 있다²⁰⁾. 그러나 설사 다른 부위로 이동된다 하더라도 시간 경과에 따라 생분해되므로 염증이거나 혈관 폐쇄와 같은 합병증은 일시적일 것으로 생각된다. 구강악안면 영역에서 이식하는 부위나 그

근처에서 큰 혈관과 직접적으로 접촉할 기회는 매우 적고 게다가 전술한 바와 같이 생분해되기 때문에 인체에 큰 해는 없을 것으로 생각된다. 발치 후 즉시 치과 임플란트 식립 시에 필연적으로 수반되는 골 결손부의 성공적인 수복을 위하여 polymer scaffold와 calcium phosphate를 이용한 injectable type의 골 대체 이식재의 사용이 보고되었는데²¹⁾ 농축 혈소판 혈장(Platelet-rich plasma)을 injectable scaffold로 사용하여 골수 줄기세포와의 혼합 사용으로 농축 혈소판 혈장이나 골 이식재로 널리 사용되는 Bio-Oss 혹은 PCBM(particulate cancellous bone marrow)보다 조직학적으로, 생역학적으로 더 우수한 결과가 보고되기도 하였다²²⁾.

Scaffold에 apatite를 coating 하여 골모세포의 부착, 증식 및 분화를 촉진시킬 수 있는 것으로 알려져 있는데 apatite가 잘 coating되고 성장하게 하기 위해서는 scaffold의 표면이 음성 charge를 가지도록 하는 표면 처리(surface functionalization), 칼슘 이온의 chelation을 통한 표면 석회화(surface calcification)가 필요하다²³⁾. 본 연구에서는 PLLA microparticle과 HA의 합성을 통해 composite scaffold를 제조하여 이용하였는데 PLLA는 polyester 결합이므로 hydrolysis로 표면처리가 가능하다. 즉 물 분자에 의해서 ester bond가 hydrolysis 되어 음전하를 나타내는 carboxylic acid group으로 분해되고 이렇게 음전하를 나타내는 PLLA에 칼슘 이온이 chelation하게 되어 surface nucleation이 일어나고 치아와 골에서 발생하는 과정과 유사하게 골전도성이 있으며 *in vivo* 상에서 흡수성을 지닌 무기질의 침착 및 성장이 발생된다²³⁾. 생체내의 hydroxyapatite는 음전하를 나타내어 apatite를 형성하고 여기에 세포가 부착되어 골 형성을 촉진시키지만 단백질의 흡수는 apatite의 형성을 감소시키는 것으로 알려지고 있다^{24,25)}. Ca-P으로 scaffold를 coating함으로써 scaffold의 기계적 강도가 증가되어 골이 증식, 분화하는 동안에 cellular contraction force를 견디고 scaffold 수축도 방지할 수 있는 장점도 있다.

PLLA는 *in vitro*에서보다 *in vivo*에서 분해속도가 더 빠른 것으로 알려져 있는데 PLLA의 분해산물은 pH를 낮추며 이것이 골의 탈회를 일으키지만 혈관이 내부로 성장해 들어와 분해산물을 급속히 제거하기 때문에 무기질의 침착은 감소시키지 않은 것으로 알려지고 있다²⁶⁾. 실제로 PLGA의 분해로 인한 pH의 감소는 골 형성과 혈관 형성을 막을 정도로 크지 않으며²⁷⁾ 마그네슘 하이드록사이드와 같은 buffering base를 PLGA microsphere에 첨가함으로써 pH의 심각한 저하를 방지할 수 있는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

Apatite의 침착으로 섬유조직이 골 결손부로 증식하는 것

이 감소되고 골조직의 증식이 증가되며 이식체와 골의 직접적인 접촉이 향상되고 골수 줄기세포의 골모세포로의 분화가 촉진되는 것으로 알려져 있지만²⁹⁻⁴¹⁾ 이에 대한 자세한 기전은 밝혀지지 않은 상태이다. 이와는 달리 apatite 상에서 골모세포의 증식이 억제된다는 보고도 있으며^{42,43)} 골모세포로의 분화에 별 영향이 없는 결과가 보고도 있는 실정이며⁴⁴⁾ 오히려 amorphous calcium phosphate 같은 calcium phosphate mineral은 *in vitro*와 *in vivo*에서 골모세포로의 분화를 억제하고 세포배양에 독성을 일으켰다는 보고도 있는데⁴⁵⁾ 이는 무기질의 종류, 세포의 종류, 세포 채취 방법의 차이 등에 의한 것으로 추정되고 있다⁴⁶⁾.

rhBMP-2를 polymer scaffold에 첨가함으로써 골 유도능이 향상되어 신생골 형성이 촉진되고 scaffold의 흡수가 촉진되는 것으로 알려지고 있는데⁴⁷⁾ 골 형성과 발달에 관여하는 것으로 알려진 성장인자는 BMP, transforming growth factor- β (TGF- β), insulin growth factor(IGF), fibroblast growth factor(FGF), platelet derived growth factor(PDGF), Interleukin-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 등이 있는데 이중 BMP는 1965년 Urist⁴⁸⁾에 의해 처음 보고되고 BMP로 명명된 이래 많은 연구가 진행되고 있다. BMP는 배아 단계에서 조직과 기관의 형성에 관여하고 신체형태, 사지의 발달, 골의 크기와 수에 영향을 미치며 태생 후 연골 및 골형성의 조절에 관여한다. BMP-2는 골모세포의 골 형성 단백질 phenotype의 증가를 유도하는데 단지 분화된 골모세포에만 영향을 미치는게 아니라 미분화성 골전구세포에도 영향을 미쳐서 골모세포로의 분화를 유도한다. 유전자 재조합 기술의 발전으로 재조합 인간 BMP(rhBMP)은 다양한 세포실험이나 생체실험에서 활용 가능할 정도로 충분한 양의 생산이 가능하여 졌다. rhBMP를 이용하여 다양한 동물실험 모델을 이용하여 골 형성을 유도하는 다양한 보고와⁴⁹⁻⁵⁶⁾ 제한적이지만 실제 임상에서의 적용^{55,56)}이 보고되고 있지만 현재까지는 효과적으로 임상에서 사용되지는 못하고 있는 실정이다. BMP-2는 조절인자로서 골재생을 유도할수 있지만 성장인자-매개 골유도기전은 세포의 존재에 의존한다. Lane 등⁵⁷⁾은 rhBMP-2 단독 사용시보다 rhBMP-2와 골수 줄기세포와의 병용을 통해 더욱 좋은 결과를 보고하고 있다. 최근에 와서 성공적인 조직공학적 골재생에 다양한 종류의 골유도 물질 및 신생혈관 형성 유도물질 등이 시도되고 있으나 Lane 등⁵⁷⁾은 임상적으로 성공적인 골재생에 이용되기 위해서는 더 많은 연구가 필요한 것으로 보고하고 있다. 골형성에 영향을 미치는 scaffold에 의한 분자생물학적 영향이 성공적인 조직공학적 골재생에 필수적이라 생각된다. 골형성에 관련된 성장 인자인 BMP를 사용하는 방법

은 많은 연구와 동물실험이 진행되었지만 아직 임상적으로 많이 사용되지 못하고 있는데, 이는 골 결손 부위에 적용된 BMP가 효과적으로 작용하지 못하고 상당히 고가인 BMP를 많은 양으로 사용하여야 하는 것이 주된 원인이다. BMP를 이식골과 함께 또는 단독으로 골결손 부위에 사용하였을 때 BMP가 효과적으로 작용을 하기 위한 주위 여건이 이루어지기 전에 많은 부분의 BMP가 그 기능을 다해 버려 골형성에 효과적이지 못하게 되는 것이다. 따라서, BMP가 서서히 배출되고 지속적으로 작용하며, 골세포가 잘 부착될 수 있는 scaffold의 개발이 필요하다. BMP가 효과적으로 방출되는, 골형성을 위한 scaffold의 개발은 현재까지 주로 PLGA를 사용하여 다공성 scaffold를 제작하여, 골세포의 성장을 효과적으로 향상시켜 골 형성을 촉진하는 것을 목표로 한다. 본 연구에서와 같이 HA가 첨가된 scaffold가 사용하기도 하는데 PLGA scaffold는 생분해능이 있어 일정 시간이 지나면 분해되어, 새로운 골조직으로 대체되지만, 1) 조직의 remodeling되는 속도와 scaffold의 분해 속도가 일치하지 않고, 2) BMP가 첨가된 구조물의 제작이 복잡하고, 3) 또한 첨가된 BMP가 scaffold의 불안정성, 첨가과정이나 첨가된 후 PLLA와의 작용으로 인한 변형 등을 통하여 활성을 잃게 되는 문제점들이 있다. 덧붙여서, 4) 고체상의 다공성 scaffold이므로, 이식부위의 형태와 정확히 일치시킬 수 없는 문제점이 있어 이런 문제에 대한 해결책이 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

PLLA/HA composite scaffold를 double emulsion-solvent evaporation 법을 사용하여 제조하고 HA와 1:1 volume으로 혼합하여 PLLA/HA composite scaffold를 제조하여 백서 두개부 골결손부에 골모세포 및 rhBMP-2와 함께 투여하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PLLA의 표면에 hydroxyapatite (HA)를 노출시켜 PLLA/HA composite scaffold를 제조할 수 있었다.
2. HA가 표면에 노출되도록 제조된 PLLA/HA composite scaffold는 HA를 포함하지 않는 경우보다 신생골의 형성이 증가되었다.

본 연구의 결과로 PLLA microparticle에 apatite를 코팅하면 골재생용 composite scaffold로 사용이 가능하리라 생각되지만 향후 이에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

REFERENCES

1. Li Z, Yubao L, Aiping Y *et al* : Preparation and *in vitro* investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials. *J Mater Sci Mater Med* 16 : 213, 2005.
2. Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H *et al* : Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in vitro* and *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med* 17 : 327, 2006.
3. Linhart W, Peters F, Lehmann W *et al* : Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *J Biomed Mater Res* 54 : 162, 2001.
4. Young CS, Abukawa H, Asrican R *et al* : Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng* 11 : 1599, 2005.
5. Jung Y, Kim SS, Kim YH *et al* : A poly(lactic acid)/calcium metaphosphate composite for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26 : 6314, 2005.
6. Montjovent MO, Mathieu L, Hinz B *et al* : Biocompatibility of bioresorbable poly(L-lactic acid) composite scaffolds obtained by supercritical gas foaming with human fetal bone cells. *Tissue Eng* 11 : 1640, 2005.
7. Rohner D, Huttmacher DW, Cheng TK *et al* : *In vivo* efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 15:66 : 574, 2003.
8. Williams JM, Adewunmi A, Schek RM *et al* : Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* 26 : 4817, 2005.
9. Iejima D, Saito T, Uemura T : A collagen-phosphoryn sponge as a scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 14 : 1097, 2003.
10. Domaschke H, Gelinsky M, Burmeister B *et al* : *In vitro* ossification and remodeling of mineralized collagen I scaffolds. *Tissue Eng* 12 : 949, 2006.
11. Li Z, Ramay HR, Hauch KD *et al* : Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26 : 3919, 2005.
12. Abbah SA, Lu WW, Chan D *et al* : *In vitro* evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute. *Biochem Biophys Res Commun* 18:347 : 185, 2006.
13. Fujibayashi S, Neo M, Kim HM *et al* : A comparative study between *in vivo* bone ingrowth and *in vitro*, apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses *Biomaterials* 24 : 1349, 2003.
14. Tanahashi M, Yao T, Kokubo T *et al* : Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process *Am Ceram Soc* 77 : 2805, 1994.
15. Tanahashi M, Yao T, Kokubo T *et al* : Apatite coated on organic polymers by biomimetic process: improvement in its adhesion to substrate by glow-discharge treatment *J Biomed Mater Res* 29 : 349, 1995.
16. Somasundaran P, Markovic B : Interfacial properties of calcium phosphate in biological and industrial system, Switzerland, Tran Tech Pub, 1998, p.85.
17. Chun KW, Yoo HS, Yoon JJ *et al* : Biodegradable PLGA microcarriers for injectable delivery of chondrocytes: Effect of surface modification on cell attachment and function *Biotechnol Prog* 20 : 1797, 2004.

18. Cho ER, Kang SW, Kim BS : Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as a potential bulking agent for urological injection therapy: Preliminary results J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater 72B 166, 2005.
19. Kershen RT, Atala A : New advances in injectable therapies for the treatment of incontinence and vesicoureteral reflex Urol Clin North Am 26 : 81, 1999.
20. Morhenn VB, Lemperle G, Gallo RL : Phagocytosis of different particulate dermal filler substances by human macrophages and skin cells Dermatol Surg 28 : 484, 2002.
21. Boix D, Gauthier O, Guicheux J *et al* : Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: An experimental study in dogs J Periodontol 75 : 663, 2004.
22. Ito K, Yamada Y, Nagasaka T *et al* : Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: A comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings J Biomed Mater Res 73A : 63, 2005.
23. Murphy WL, Kohn DH, Mooney DJ : Growth of continuous bonelike mineral within porous poly(lactide-co-glycolide) scaffolds *in vitro* J Biomed Mater Res 50 : 50, 2000.
24. Helen LH, Pollak SR, Ducheyene P : 45S5 bioactive glass surface charge variations and the formation of a surface calcium phosphate layer in a solution containing fibronectin J Biomed Mater Res 54 : 454, 2001.
25. Kokubo T, Himeno T, Kim HM *et al* : Process of bone like apatite formation on sintered hydroxyapatite in serum-containing protein Bioceramics, Switzerland, Tran Tech Pub, 2003, vol 16 p.139.
26. Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW *et al* : Polymer concepts in tissue engineering J Biomed Mater Res (Appl Biomater) 43 : 422, 1998.
27. Martin C, Winet H, Bao JY : Acidity near eroding polylactide-polyglycolide *in vitro* and *in vivo* in rabbit tibial bone chambers Biomaterials 17 : 2373, 1996.
28. Zhu G, Mallery SR, Schwendeman SP : Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly(lactide-co-glycolide) Nat Biotechnol 18 : 52, 2000.
29. Nagano M, Kitsugi T, Nakamura T *et al* : Bone bonding ability of an apatite-coated polymer produced using a biomimetic method: a mechanical and histological study *in vivo* J Biomed Mater Res 31 : 487, 1996.
30. Yan WQ, Nakamura T, Kawanabe K *et al* : Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants Biomaterials 18 : 1185, 1997.
31. Li P : Biomimetic nano-apatite coating capable of promoting bone ingrowth J Biomed Mater Res 66A : 79, 2003.
32. Barrere F, van der Valk CM, Meijer G *et al* : Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats J Biomed Mater Res 67B : 655, 2003.
33. Gundle R, Joyner CJ, Triffitt JT : Human bone tissue formation in diffusion chamber culture *in vivo* by bone-derived cells and marrow stromal fibroblastic cells Bone 16 : 597, 1995.
34. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K *et al* : Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells Transplantation 66 : 1272, 1998.
35. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P *et al* : Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application Crit Rev Oral Biol Med 10 : 165, 1999.
36. Martin I, Muraglia A, Campanile G *et al* : Fibroblast growth factor-2 supports *ex vivo* expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow Endocrinology 138 : 4456, 1997.
37. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM *et al* : Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow Bone 13 : 81, 1992.
38. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S *et al* : Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation J Biomed Mater Res 24 : 1563, 1990.
39. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K *et al* : Bone formation *in vivo*: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts Transplantation 63 : 1059, 1997.
40. Petite H, Viateau V, Bensaid W *et al* : tissue-engineered bone regeneration Nat Biotechnol 18 : 959, 2000.
41. Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D *et al* : Bone regeneration via biomimetic presentation and induced angiogenesis J Dental Res 83 : 204, 2004.
42. Oreffo RO, Driessens FC, Planell JA *et al* : Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements Biomaterials 19 : 1845, 1998.
43. Oreffo RO, Driessens FC, Planell JA *et al* : Effects of novel calcium phosphate cements on human bone marrow fibroblastic cells Tissue Eng 4 : 293, 1998.
44. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG *et al* : Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength Biomaterials 22 : 87, 2001.
45. Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U *et al* : TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model Biomaterials 23 : 1689, 2003.
46. Murphy WL, Hsiong S, Richardson TP *et al* : Effects of a bone-like mineral film on phenotype of adult human mesenchymal stem cells *in vitro* Biomaterials 26 : 303, 2005.
47. Boyan BD, Lohmann CH, Somers A *et al* : Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction *in vivo* J Biomed Mater Res 46 : 51, 1999.
48. Urist MR : Bone formation by autoinduction. Science 150 : 893, 1965.
49. Lieberman JR, Le LQ, Wu L *et al* : Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. J Orthop Res 16 : 330, 1998.
50. Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D *et al* : Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. J Cell Biol 130 : 217, 1995.
51. Wikesjo UM, Sigurdsson TJ, Lee MB *et al* : Dynamics of wound healing in periodontal regenerative therapy. J Calif Dent Assoc 23 : 30, 1995.
52. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ *et al* : Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. Clin Orthop Relat Res (293) : 317, 1993.
53. Origuchi N, Ishidou Y, Nagamine T *et al* : The spatial and

- temporal immunolocalization of TGF-beta 1 and bone morphogenetic protein-2/-4 in phallic bone formation in inbred Sprague Dawley male rats. *In Vivo* 12 : 473, 1998.
54. Isobe M, Yamazaki Y, Mori M *et al* : The role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in PLGA capsules at an extraskeletal site of the rat. *J Biomed Mater Res* 45 : 36, 1999.
55. Boyne PJ : Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 2) : S146, 2001.
56. Khan SN, Lane JM : The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. *Expert Opin Biol Ther* 4 : 741, 2004.
57. Friedenstein A, Kuralesova AI : Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 12 : 99, 1971.

저자 연락처

우편번호 425-707
경기도 안산시 단원구 고잔동 516번지
고려대학교 안산병원 치과·구강악안면외과
장 현 석

원고 접수일 2008년 1월 28일
게재 확정일 2008년 7월 8일

Reprint Requests

Hyonseok Jang
Department of Oral & Maxillofacial Surgery,
School of Medicine, Korea University
516 Gozan-dong, Danwon-gu, Ansan, Gyeonggy, 425-707, Korea
Tel: 82-31-412-5370, 5956 Fax: 82-31-401-7125
E-mail: omfs1109@korea.ac.kr

Paper received 28 January 2008
Paper accepted 8 July 2008