

# 미니돼지에서 자가 피부유래 간엽성 줄기세포를 이용한 상악동저 거상술

변준호<sup>1</sup> · 강은주<sup>2</sup> · 맹근호<sup>2</sup> · 노규진<sup>2</sup> · 강동호<sup>3</sup> · 이종실<sup>4</sup> · 박봉욱<sup>1</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 의학전문대학원 치과학교실 구강악안면외과, 경상대학교 건강과학연구원, <sup>2</sup>경상대학교 수의과대학 수의산과학,

<sup>3</sup>경상대학교 의학전문대학원 신경외과학교실, <sup>4</sup>경상대학교 의학전문대학원 병리학교실

**Abstract** (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:87-93)

## Maxillary sinus floor elevation using autogenous skin-derived mesenchymal stem cells in miniature pigs

June-Ho Byun<sup>1</sup>, Eun-Ju Kang<sup>2</sup>, Geun-Ho Maeng<sup>2</sup>, Gyu-Jin Rho<sup>2</sup>, Dong-Ho Kang<sup>3</sup>, Jong-Sil Lee<sup>4</sup>, Bong-Wook Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine and Institute of Health Science, Gyeongsang National University,

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, <sup>3</sup>Departments of Neurosurgery and <sup>4</sup>Pathology, School of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

**Introduction:** In our previous studies, we isolated porcine skin-derived mesenchymal stem cells (pSDMSCs) from the ears of adult miniature pigs and evaluated the pluripotency of these pSDMSCs based on expressions of transcription factors, such as Oct-4, Sox-2, and Nanog. Moreover, the characteristic of mesenchymal stem cells was revealed by the expression of various mesenchymal stem cell markers, including CD29, CD44, CD90, and vimentin. The aim of this study was to evaluate *in vivo* osteogenesis after maxillary sinus lift procedures with autogenous pSDMSCs and scaffold.

**Materials and Methods:** The autogenous pSDMSCs were isolated from the 4 miniature pigs, and cultured to 3rd passage with same methods of our previous studies. After cell membranes were labeled using a PKH26,  $1 \times 10^7$  cells/100  $\mu$ L of autogenous pSDMSCs were grafted into the maxillary sinus with a demineralized bone matrix (DBM) and fibrin glue scaffold. In the contralateral control side, only a scaffold was grafted, without SDMSCs. After two animals each were euthanized at 2 and 4 weeks after grafting, the *in vivo* osteogenesis was evaluated with histomorphometric and osteocalcin immunohistochemical studies.

**Results:** *In vivo* PKH26 expression was detected in all specimens at 2 and 4 weeks after grafting. Trabecular bone formation and osteocalcin expression were more pronounced around the grafted materials in the autogenous pSDMSCs-grafted group compared to the control group. Newly generated bone was observed growing from the periphery to the center of the grafted material.

**Conclusion:** The results of the present study suggest that autogenous skin-derived mesenchymal stem cells grafting with a DBM and fibrin glue scaffold can be a predictable method in the maxillary sinus floor elevation technique for implant surgery.

**Key words:** Skin-derived mesenchymal stem cells, Tissue engineering, *In vivo* osteogenesis, Maxillary sinus floor elevation.

(원고접수일 2010. 1. 26 / 1차수정일 2010. 2. 10 / 2차수정일 2010. 3. 5 / 게재확정일 2010. 3. 18)

## I. 서 론

상악구치부에서 치아 발치 후 상악동의 함기화와 치조골의 흡수는 임플란트 시술을 어렵게 한다. 이러한 경우 성공적인 임플란트 시술을 위해 상악동저 거상술을 이용하는 데, 이 시술은 Boyne 등<sup>1</sup>이 처음으로 상악동저에 자가골 이식술을 소개하고, Tatum<sup>2</sup>이 측방 접근법을 이용한 상악동

저 증강술을 발표함으로써 급속히 발전하였다. 상악동저 증강술에 이용하는 재료로는 자가골이 가장 우수하다고 알려져 있지만, 이는 공여부 수술이 필요하고, 이식 가능한 골량이 제한적인 단점이 있다<sup>3</sup>. 이에 비해 동종골 및 합성골 등은 자가골의 부족함을 충족하기에 좋은 재료이지만, 이 또한 면역반응이 나타날 수 있으며, 이식 후 골질이 좋지 못한 단점이 있다<sup>4</sup>. 이에 최근에는 조직공학적 골을 이용한 상악동저 증강술을 시도하고 있으며, 특히, 자가조직의 일부를 이용한 조직공학적 골이식은 자가 골이식에 따른 공여부 합병증이나 합성 골이식에 따른 면역반응 등을 모두 줄일 수 있는 큰 장점이 있다<sup>5</sup>. 조직공학을 이용한 골형성에는 다능성의 전구세포나 줄기세포가 반드시 필요한데, 문헌 고찰에서 현재까지 골수유래 간엽성 줄기세포<sup>6,7</sup>, 골막유래 전구세포<sup>3,8,9</sup>, 그리고 자가골 유래 세포<sup>10</sup> 등이 조

### 박 봉 욱

660-702 경남 진주시 칠암동 90

경상대학교 의학전문대학원 치과학교실 구강악안면외과

### Bong-Wook Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University

90 Chilam-dong, Jinju, Gyeongnam, 660-702, Korea

TEL: +82-55-750-8264 FAX: +82-55-761-7024

E-mail: parkbw@gsnu.ac.kr

\*이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임.(KRF-2008-313-E00577)

직공학적 골형성의 주요 세포 공급원(source)으로 사용 되어왔다. 하지만, 경우에 따라서는 골수 등의 조직을 얻는데도 침습적인 시술이 필요할 수 있으며, 이에 따른 출혈, 혈종 형성, 감염, 그리고 동통 등의 합병증이 발생할 가능성은 언제든지 있다.

지금까지의 연구들에서 골수, 제대혈, 지방조직, 혈액, 치아조직, 그리고 피부조직 등의 많은 조직들에서 성체줄기세포를 추출하고 배양하였다. 이중 피부는 비교적 최근에 줄기세포 추출의 기원으로 연구하는 조직으로 최소한의 침습적인 과정으로 쉽게 획득할 수 있으며, 다양한 기원의 전구세포와 줄기세포들이 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>11</sup>. 피부 내에서 발견되는 전구세포 또는 줄기세포는 주로 피부 내의 모낭 및 분비선 주변에서 발견되는 간엽성 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs), 표피에서 발견되는 표피성 줄기세포(epidermal stem cells), 그리고 진피 내에 있으면서 태생기 시 신경능 기원(neural crest origin)의 피부유래 전구세포(skin-derived progenitors, SKPs) 등으로 구분할 수 있다<sup>11-14</sup>. 이중 SKPs를 피부 내의 줄기세포 중 가장 많이 연구하였으며, Toma 등<sup>15</sup>이 설치류의 피부에서 처음으로 추출하였다. 이런 SKPs는 피부조직 중 진피를 세포단위로 분리한 후 혈청이 없는 배지에서 배양액에 떠오르는 세포 덩어리(floating sphere)를 형성하는 것이 초기 세포배양 상의 특징이며, 이들 세포는 모두 태생기 시 신경능 기원으로 피부 내에서 미분화 상태로 잠재되어 있는 것을 분리한 것이다. 따라서 이러한 SKPs는 신경능 유래 줄기세포(neural crest-derived stem cells)와 같은 특징을 보이며, 향후 신경조직의 재생에 유용하게 사용할 수 있으리라 기대한다<sup>15-17</sup>. 이에 반해 MSCs는 몇 가지 특징을 보이는데, 첫째로 배양관에 부착된 상태(adherent state)로 배양되며, 둘째 몇 가지 세포표면 표시자(cell surface markers)에 양성이며(CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 등), 셋째로 배지(in vitro) 상에서 지방, 골 및 연골세포로 분화가 가능한 점 등이 MSCs의 가장 큰 특징이다<sup>18</sup>. Riekstina 등<sup>12</sup>은 인간의 피부에서 전통적인 SKPs를 추출하는 방법과 달리, 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 함유된 배지에 fibroblast growth factor-2 (FGF-2)를 추가하여 배지바닥에 피부유래 세포를 부착한 상태로 세포를 배양하였고, 여기에서 MSCs의 특징을 발견하고 이를 피부유래 간엽성 줄기세포(skin-derived MSCs, SDMSCs)라 명명하였다. 이러한 방법은 저자 등이 선행연구에서 피부유래 줄기세포를 추출한 방법과 유사한 방법으로, 미니돼지의 이부 피부를 DMEM/F12 배지에 FBS, endothelial growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), 그리고 penicillin과 streptomycin을 혼합한 배지에서 약 3-4주간 배양하여 피부유래 세포들을 추출하였다<sup>19-21</sup>. 또한, 이들 세포에서 초기 전사인자의 발현을 관찰하여 다능성(multipotent or pluripotent)의 특징을 확인하였고, 또한 골세포, 지방세포 및 신경세포로의 분화가 일어남을 관찰하여 이들이 다배엽성(multilineage) 특징을 지니고

있음을 증명하였다. 또한 CD29, CD44, CD90, 그리고 vimentin 같은 MSCs의 표시자가 모두 발현됨을 관찰하였다. 이러한 결과로 선행연구에서 추출한 피부유래 줄기세포를 신경능 기원의 SKPs와는 다른 SDMSCs라 할 수 있었다<sup>21</sup>.

본 연구는 미니돼지의 이부에서 추출한 porcine SDMSCs (pSDMSCs)를 생체 내 이식하였을 경우 생체 내 골화정도에 대한 평가를 목적으로 자가 pSDMSCs를 탈회골(demineralized bone matrix, DBM)과 fibrin glue를 혼합한 scaffold와 같이 상악동저에 이식하여 2주와 4주 후 상악동 내 골화정도를 조직학적 및 osteocalcin에 대한 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 동물모델 및 SDMSCs의 추출

실험에 사용한 동물모델과 이부 피부에서 MSCs를 추출하고 배양하는 방법은 동물실험에 대한 윤리기준을 준수하면서 선행연구와 동일한 방법을 사용하였다<sup>19-21</sup>. 체중 25 kg 내외의 생후 6개월에서 1년 사이의 성체 미니돼지 4두를 실험에 사용하였다. 실험동물을 마취 후 이첨부 피부를 채취한 후 약 1-2 mm<sup>2</sup> 크기로 피부절편을 자른 후 DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 10% FBS (Invitrogen), 10 ng/mL EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 ng/mL bFGF (Sigma-Aldrich), 그리고 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich) 및 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich)의 항생제를 혼합한 배지에서 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>와 humidity 조건으로 1차 배양하였다. 일차 배양 2-3일 후 피부조직에서 탈락된 세포가 배지에 부착된 것을 확인하고 남은 피부조직 절편은 forceps으로 제거하였다. 이 시기에는 배지를 하루에 1번씩 교체하고, 피부절편을 제거한 후에는 1주에 2번씩 배지를 교체하며, confluent cells은 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Invitrogen)으로 처리 후 계대배양(subculture) 하였다.

### 2. PKH26으로 세포막의 형광염색

삼차 계대배양 한 피부유래 줄기세포가 약 70% 정도의 confluent에 도달하면, 세포막을 PKH26 형광 kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 제조회사의 방법으로 형광염색(labeling) 한다. 요약하면, trypsin-EDTA를 이용하여 배양된 세포들을 분리한 후 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Invitrogen)를 이용하여 세척하며, 이후 400 × g로 5분간 원심분리 한다. 1 mL의 Diluent C와 1 mL의 4 × 10<sup>-6</sup> molar PKH26 dye를 첨가한 후 25°C에서 5분간 반응시킨다. 이후 2 mL의 10% FBS를 1분간 반응시키고, 마지막으로 염색된 세포는 DMEM/F12로 3회 세척한다.

### 3. 자가 피부유래 줄기세포와 DBM 및 fibrin scaffold를 이용한 상악동저 거상술

실험동물은 10 mg/kg의 tiletamine-zolazepam (Zoletil, Virbac, Carros, France)으로 전신마취 후 다른 실험연구와 동일하게 구의 접근법으로 미니돼지의 양측 상악동 전벽을 노출시킨다. 실험측의 상악동 전벽에 직경 1 cm의 골창을 형성한 후 상악동 점막(Schneider's membrane)을 거상하고(Fig. 1. A), 상악동 측벽과 점막 사이의 공간에 PKH26로 염색한  $1 \times 10^7$  cells/100  $\mu$ L의 자가 피부유래 간엽성 줄기세포(pSDMSCs)를 0.25 cc의 DBM (Grafton, Osteotech, Eatontown, NJ, USA)와 0.3 mL의 fibrin glue (Greenplast kit, Green Cross, Yongin, Korea)와 혼합하여 조심스럽게 이식하였다. 이식 시 상악동 내에 DBM을 먼저 이식하여 적절한 공간을 차지하게 한 후, pSDMSCs를 fibrin glue에 혼합한 후 상악동 내에 주사하는 방식으로 이식하였다. 반대측 대조군 상악동에는 피부유래 세포를 넣지 않은 같은 양의 스키폴드 혼합물만 이식하였다. 마지막으로 골창은 흡수성 차단막(Lyoplant, Aesculap, Melsungen, Germany)으로 피개한 후 근육층과 피부층의 이중 봉합을 실시하였으며, 실험동물에게 항생제(Cefazolin, Yuhan Corp., Seoul, Korea)를 5일 동안, 소염제(Meloxicam, Boehringer Ingerlheim, Ingelheim, Germany)를 1일 근육주사로 투여하였다.

### 4. 생체 내 골화정도의 조직학적 평가

실험 2주 및 4주 후 각각 2두의 실험동물을 전신마취 후 KCl을 정맥주사하여 희생하였다. 조직학적 분석을 위하여 실험군과 대조군의 양측 상악동을 *en bloc*으로 채취하였고, 채취한 조직은 각각 조직학적 분석과 형광분석을 위하여 두 편으로 분리하였다.

한편의 조직은 10% 중성 포르말린에 12시간 고정 후 5% 질산에서 약 3일간 탈회하였다. 조직을 파라핀 블록으로

만든 후 4  $\mu$ m 두께로 절편을 만든 후 silane을 코팅한 slide glass에 부착하였다. 면역조직화학염색은 조직이 부착된 slide glass를 실온에서 12시간 보관한 후 Tris-EDTA buffer (LabVision, Thermo Fisher Scientific Inc., Fremont, CA, USA)에 담구어 PTmodule (Labvision) 내에서 100°C에서 25분간 반응시켜서 탈파라핀과 전처리를 동시에 시행하였으며, 이후 Tris Buffered Sialine (TBS, LabVision)액에 3분간 2회 세척하였다. 내인성 peroxidase를 차단하기 위해 과산화수소수(hydrogen peroxide)를 실온에서 10분간 반응시켰고, TBS에 3분간 2회 세척하였다. Osteocalcin에 대한 1차항체는 1:200으로 희석한 primary mouse monoclonal antibody IgG2a (MA1-5071, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하였으며, 자동면역염색기(Lab Vision Autostainer, Lab Vision)를 사용하여 37°C에서 40분간 1차항체를 반응시켰고, 이후 slide glass를 biotin을 부착한 2차항체인 biotinylated polyvalent secondary antibody 용액으로 처리하였고, horseradish peroxidase-conjugated avidin-biotin complex로 반응시킨 후 3,3-diaminobenzidine과 hydrogen peroxide를 사용하여 발색하였으며, hematoxylin으로 핵을 대조염색하였다. Hematoxylin-eosin 염색 및 osteocalcin 면역염색에 대한 조직학적 분석은 대조군 및 실험군에서 최소 3개 이상의 조직표본을 제작하여 광학현미경으로 실험에 대한 사진 지식이 없는 2명의 병리학자가 실시하였다. 특히 세포단위의 osteocalcin 발현여부는 신생 골소주 주변의 골모세포(osteoblasts), 신생골 내의 골세포(osteocytes), 그리고 골소주 사이 결합조직 내의 미성숙 섬유모세포-유사세포(immature fibroblast-like cells)을 중심으로 조사하였다.

다른 한편의 조직은 PKH26의 형광 발현을 보기 위한 것으로 신선조직을 cryomold에 올린 후 O.C.T. compound (Tissue-Tek, Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 처리 후 -23°C로 급속 냉동한다. 냉동된 조직을 Cryocut (LEICA CM3050S, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 4  $\mu$ m 크기로 자른 후 silane이 코팅된 slide glass에 올린다. slide glass는 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, VECTASHEID, Vector Lab., CA, USA)로 염색하여 형광 발현을 형광현미경(Olympus BX51, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)하에서 관찰하고, 형광카메라(Olympus DP72, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)로 촬영하였다.

## III. 연구 결과

### 1. pSDMSCs 추출 및 특성화

선행연구<sup>19,21</sup>에서와 같이 미니돼지 이부 피부에서 추출한 세포는 1차배양 시에는 다양한 형태를 보이며 불규칙적이었으며, 2차 및 3차 계대배양을 거치면서 안정된 균일한 모양을 보였다. 이들 세포에서 Oct-4, Nanog 및 Sox-2의 초기 전사인자의 발현과 CD29, CD44, CD90, 그리고 vimentin 등



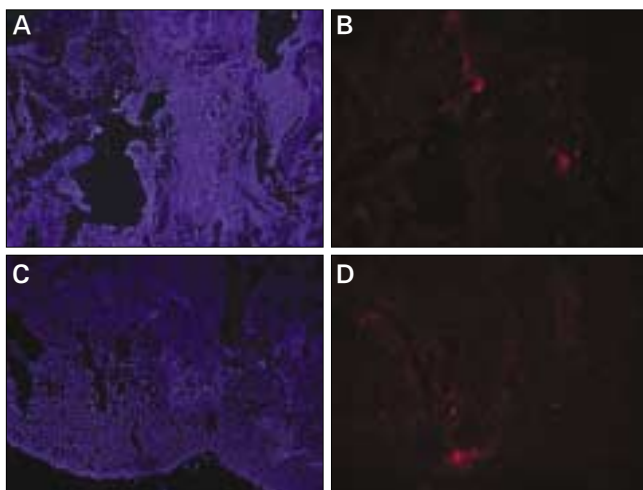
**Fig. 1.** Maxillary sinus floor elevation using autogenous porcine skin-derived mesenchymal stem cells. (pSDMSCs) A. The lateral window was formed via an extraoral approach in the anterior wall of the maxillary sinus. B. Augmented graft material was found under Schneider's membrane in the harvested specimen. (arrow)

의 MSCs 표시자의 발현을 관찰할 수 있었다. 또한, 이들 세포를 배지상에서 골세포, 지방세포, 그리고 신경세포 등으로 유도분화 시 모두 성공적으로 분화가 일어남을 관찰하였다. 이러한 결과로 본 연구에서 미니돼지의 이부 피부에서 추출한 세포는 다능성의 특징을 지닌 피부유래 간엽성 줄기세포(pSDMSCs)라 할 수 있다.

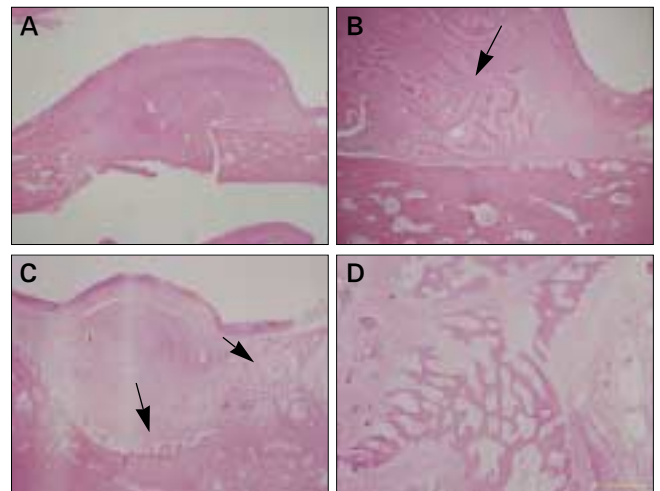
2. 상악동 내 자가 pSDMSCs의 이식 후 생체 내 골화정도

이식 후 채취한 조직의 육안적 소견으로도 상악동 점막 하방으로 이식체가 잘 보존되면서 치유된 상태를 관찰할 수 있었고(Fig. 1. B), 이식 2주 및 4주 후의 모든 실험군의 상악동 조직절편에서 모두 PKH26의 발현을 관찰할 수 있었다.(Fig. 2) 이는 이식한 4주까지 이식된 자가 pSDMSCs가 생존하면서 증식했다는 의미로 해석할 수 있다. Hematoxylin-eosin 염색 후 광학현미경사진에서도 상악동저에 이식된 이식체는 잘 보존되고 있었다. 이식 2주 후의 조직학적 소견으로는 자가 피부유래 줄기세포를 이식하지 않은 대조군 비하여 피부유래 줄기세포를 이식한 실험군에서 월등히 높은 신생골 형성을 관찰할 수 있었다.(Fig. 3) 이식 4주 후의 조직은 2주 후의 조직에서 보다 더 많은 신생골 형성 정도를 관찰하였고(Fig. 4), 또한 이 시기의 실험군 조직에서 신생골의 경화를 관찰하였다.(Figs. 4. C, D) 골화와 경화는 상악동저 이식체의 중앙보다 변연부에서 진행되어 중앙으로 골화가 진행되는 양태를 보였다.

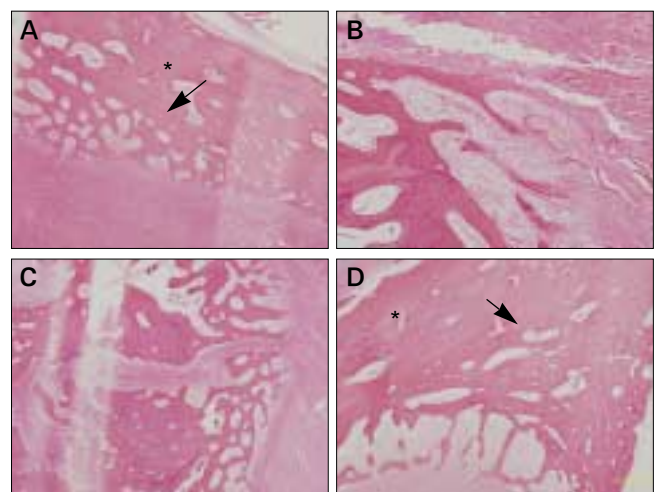
자가 피부유래 줄기세포를 이식한 실험군의 2주와 4주 후의 조직 모두에서 대조군보다 월등히 높은 osteocalcin의



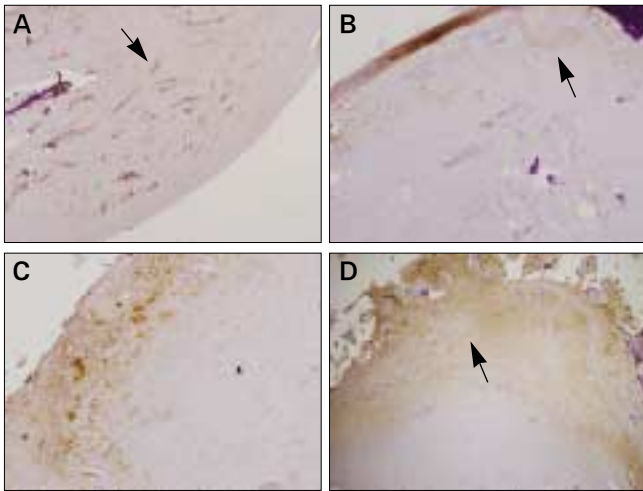
**Fig. 2.** Cell labeling with PKH26. (A & B: 2 weeks after sinus grafting, x40 magnification; C & D: 4 weeks after grafting, x100 magnification) A. Numerous cells were observed in DAPI staining. B. PKH26 positive cells were plentifully detected in the same specimen. C, D. Abundant DAPI and PKH26 positive cells were also observed in the specimens of 4 weeks after sinus grafting.



**Fig. 3.** Histological features at 2 weeks after autogenous pSDMSCs grafting in the maxillary sinus floor. (A & C. x12 magnification; B & D, x40 magnification) A. Sinus opening and graft materials were observed in control specimen. B. High magnification of control specimen. Grafted DBM (arrow) was observed in the sinus elevated materials. However, new bone activity was barely detected in control group. C. Experimental group. The sinus grafted matrix was also detected in experimental group. Newly generated trabecular bones were clearly found in the peripheral portion of grafted material in the maxillary sinus. (arrows) D. High magnification of the experimental specimen, new bones were observed growing into the grafted materials.



**Fig. 4.** Histologic appearances of the *in vivo* generated new bones in the experimental specimens (A, x 40 magnification of 2 weeks specimen; B, x100 magnification of 2 weeks specimen; C & D, x40 magnification of 4 weeks specimens) A, B. New bone generation potential was detected in the specimens of 2 weeks after sinus grafting. C, D. More enhanced new bone generation and maturation were observed in the 4 weeks specimens compared with 2 weeks specimens. (Abbreviations: \*, basal bone; arrow, borderline of basal bone and newly generated bone; arrow head, newly generated trabecular bone)



**Fig. 5.** Immunohistochemical staining of osteocalcin in the *in vivo* osteogenesis specimens. (A, control at 2 weeks; B, control at 4 weeks; C, experimental at 2 weeks; D, experimental at 4 weeks) (x40 magnification) A. Osteocalcin was almost negatively expressed in graft material except around DBM (arrow). B. Weak osteocalcin expression around newly generated bone (arrow) was found in the sinus graft material. C. Strong osteocalcin expressions were observed in the experimental specimens at both time points. D. Higher bone-morphogenic activity (arrow) was observed with enhanced osteocalcin expression in the peripheral portion of grafted material, especially in the immature fibroblast-like cells.

발현을 관찰할 수 있었고, osteocalcin의 발현도 이식체의 중앙보다는 변연부에서 높게 발현되었다.(Fig. 5) Osteocalcin의 발현은 신생골 형성이 활발한 조직 내의 섬유모세포-유사세포, 골모세포, 그리고 골세포 등의 모든 세포에서 발현이 관찰되었지만, 섬유모세포-유사세포에서 가장 강한 발현이 보였다.

#### Ⅳ. 고 찰

상악구치부에서 성공적인 임플란트 치료를 위한 상악동저 골이식술은 현재 널리 사용하는 기술이며, 그 방법 또한 발전해 왔다. 최근에 들어 상악동저 거상술 시 골이식술을 대체하기 위한 조직공학적 방법을 연구하고 있으며, 이러한 방법들은 대부분 골수유래 세포, 골막유래 세포 및 골조직유래 세포 등의 골 및 골 주변조직에서 채취하고 분리한 세포들을 이용해 왔다<sup>7,9,10</sup>. 이러한 골수나 골조직 및 골막 등의 세포 공여조직의 채취는 안전하고 쉽게 이루어진다고 하지만, 출혈, 부종, 감염 등의 합병증이 일어날 가능성은 언제나 존재한다. 따라서 요즘은 조직공학을 위한 공여조직의 선택에서도 보다 간단하고 합병증의 가능성이 거

의 없는 소량의 피부나 지방조직을 이용하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이중 피부는 인체에서 가장 넓게 분포하는 장기이며, 많은 종류의 미분화 세포를 함유하여 줄기세포의 공여부로서 큰 장점이 있다고 알려져 있다<sup>11,22</sup>. 이에 본 연구자들은 선행연구에서 미니돼지의 이부 피부조직에서 다능성의 미분화 세포를 추출하여 배양하였고, 이들 세포에서 다양한 MSCs의 발현을 관찰함으로써, 이들 피부유래 세포가 다능성의 특징을 가진 SDMSCs임을 관찰하였다<sup>19-21</sup>.

본 연구의 목적은 미니돼지의 자가 피부유래 간엽성 줄기세포(pSDMSCs)를 상악동저에 DBM과 fibrin glue를 scaffold로 하여 이식한 후 상악동저의 골형성 정도를 관찰하는 것이다. 줄기세포나 미분화 세포를 이용한 조직공학에는 scaffold의 선택이 중요한 요점 중 하나이다. 본 연구자들은 선행연구에서 배양된 pSDMSCs를 DBM 및 fibrin glue를 실험실 배지상에서 공동 배양하였을 때, 세포 증식이 정상적으로 이루어지면서 세포수가 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, 선행연구들에서 피부유래 줄기세포를 DBM 및 fibrin glue scaffold와 골화유도배지가 아닌 일반배지(DMEM)에서 공동배양 시에도 일정기간 경과 후 골세포로 분화가 이루어짐을 관찰하였다<sup>20,21</sup>. 이는 DBM 내의 골형성 단백질(bone morphogenic proteins, BMP)의 영향으로 추측되며, 이러한 결과는 피부유래 줄기세포를 생체 내에서 골세포로 유도하려는 본 연구의 목적에 부합된다고 생각된다. Fibrin glue의 첨가에 대해서도 논란이 있을 수 있는데, 많은 연구에서 이의 사용 목적이 이식되는 세포의 초기 안정성을 향상시켜서 이식되는 줄기세포가 목적하는 부위에 응집해 있게 하기 위하여 사용한다고 하였다<sup>23,24</sup>. 자가 혈액에서 채취한 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP)이 좀 더 유용하다고 생각할 수 있다<sup>25,26</sup>. 하지만, 최근의 연구들에서 PRP가 골유도(osteoinductive) 능력을 가졌다는 점에 회의적인 연구가 많으며, PRP의 사용이 골유도 능력에는 별 영향이 없고, 단지 세포의 초기 안정화에만 관여한다는 연구들이 많다<sup>26,27</sup>. 이는 PRP나 fibrin glue 모두 유사하게 세포 이식 시 cell delivery system으로 유용하게 사용할 수 있다고 해석할 수 있다<sup>7,23,25</sup>. 따라서, 본 연구에서 상악동 내 피부유래 줄기세포의 이식과 동시에 이식한 DBM은 이식체의 기계적 강도(mechanical strength)를 향상시켜 이식체의 volume을 유지하며, fibrin glue는 이식되는 세포의 초기 안정화에 기여한다고 할 수 있겠다.

본 연구에서 자가 피부유래 간엽성 줄기세포를 이식한 2주 및 4주 후의 조직사진에서 이식전에 부착한 PKH26이 잘 보존되어 발현되고 있는 것을 관찰하였다. 이는 이식한 자가 피부유래 줄기세포가 생체 내에서 특별한 세포수의 감소 없이 관찰 시점까지 잘 생존하면서 증식하고 있다는 의미이다. 또한, 세포를 이식하지 않고 scaffold만 이식한 대조군보다 피부유래 줄기세포를 이식한 실험군에서 월등히 높은 신생골 형성을 관찰할 수 있었고, 특히, 이식 후 4

주라는 비교적 짧은 기간임에도 신생골의 경화가 상당히 진행된 것을 관찰하였다. 이는 이식된 자가 피부유래 간엽성 줄기세포가 주변 환경과 scaffold의 영향으로 골화세포들로 빠르게 분화하여 골형성을 왕성하게 이루었다고 볼 수 있다.

신생골 주변의 osteocalcin의 활성도도 실험군에서 월등히 높았으며, 특히 이식체의 중앙부 보다는 변연부에서 신생골의 형성정도와 osteocalcin의 활성도가 높았다. 이러한 결과는 이식체의 변연부에서의 혈류공급이 중앙부보다 우수하기에 변연부에서부터 신생골이 형성되어 중앙부로 성장해 들어간다고 짐작할 수 있다. 또한, 신생골 조직의 섬유모세포-유사세포, 골모세포 및 골세포 등의 거의 모든 세포수준에서 osteocalcin이 발현되었는데, 특히 아직 미성숙한 섬유모세포-유사세포에서 가장 발현이 강하였다. 이러한 결과는 골신장술(distraction osteogenesis, DO) 후의 신생골 형성과정과 유사한 결과인데, DO 과정 중에서도 골화가 이루어지는 초기에는 많은 미성숙 섬유모세포-유사세포가 나타나고, 이들이 후에 신생골이 골화가 진행될수록 골모세포, 골세포의 과정을 거치는 것을 관찰할 수 있다<sup>28</sup>.

앞으로 피부유래 줄기세포를 임상 적용하기 위해서는 많은 연구가 이루어져야 할 것이지만, 본 연구를 통해서 실험실에서 배양된 자가 피부유래 간엽성 줄기세포와 탈회골 및 fibrin glue scaffold의 혼합이 상악동저 거상술에 사용하는 다양한 골이식술을 대체할 수 있는 방법을 제시하였고 사료된다. 또한, 피부조직은 합병증 없이 쉽게 채취 가능한 장점이 있기에 향후 조직공학에 다양하게 이용할 수 있으리라 생각한다.

## V. 결 론

저자 등은 선행연구에서와 같은 방법으로 미니돼지의 피부유래 간엽성 줄기세포(pSDMSCs)를 채취하고, 이의 Oct-4, Nanog, 그리고 Sox-2의 전사인자 발현을 확인하여 미분화 다능성의 특징을 관찰하였고, 또한, CD29, CD44, CD90, 그리고 vimentin 등의 발현을 통해 MSCs의 특징도 가지고 있음을 관찰하였다. 이러한 SDMSCs의 생체 내 골화정도를 관찰하기 위해, 본 연구에서는 4두의 실험동물의 이부에서 소량의 피부를 채취한 후 이에서 자가 pSDMSCs를 추출 및 배양하였고, 이를 미니돼지의 상악동저에 DBM 및 fibrin glue scaffold와 같이 혼합하여 이식하였다. 이식 2주 및 4주 후 자가 pSDMSCs를 이식한 실험군이 scaffold만 이식한 대조군보다 월등히 많은 골형성 정도를 관찰할 수 있었고, 특히 이식 4주경 상악동저 이식체의 변연부에서 활발한 골형성과 osteocalcin의 높은 발현을 관찰하였다. 이는 상악동 이식체 주변의 혈액공급 때문일 것으로 추측되며, 특히 신생골 주변의 섬유모세포-유사세포에서 높은 osteocalcin의 발현을 관찰하였는데, 이는 골신장술 등의 신생골 형성정도 유사한 점이었다. 이의 임상 적용을 위해서는 추

가적인 많은 연구가 있어야 되겠지만, 향후 골이식술의 대체방법으로 보다 쉽고 안전하게 채취 가능한 피부유래 줄기세포를 이용할 수 있으리라 생각한다.

## References

1. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 1980;38:613-6.
2. Tatum H Jr. Maxillary and sinus Implant reconstructions. *Dent Clin North Am* 1986;30:207-29.
3. Schmelzeisen R, Schimming R, Sittlinger M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2003;31:34-9.
4. Wheeler SL, Holmes RE, Calhoun CJ. Six-year clinical and histologic study of sinus-lift grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:26-34.
5. Vacanti JP. Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixer lecture. *Arch Surg* 1988;123:545-9.
6. Chen F, Feng X, Wu W, Ouyang H, Gao Z, Cheng X, et al. Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:822-7.
7. 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.
8. 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.
9. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:724-9.
10. 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 Implants Res* 2004;15:733-40.
11. Shi C, Zhu Y, Su Y, Cheng T. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trends Biotechnol* 2006;24:48-52.
12. Riekstina U, Muceniece R, Cakstina I, Muiznieks I, Ancans J. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology* 2008;58:153-62.
13. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:339-73.
14. Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest* 2006;116:249-60.
15. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3:778-84.
16. 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.
17. Fernandes KJ, Toma JG, Miller FD. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363:185-98.
18. Rho GJ, Kumar BM, Balasubramanian SS. Porcine mesenchymal stem cells-current technological status and future perspective. *Front Biosci* 2009;14:3942-61.
19. 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.

20. Byun JH, Choi MJ, Choi YJ, Shim KM, Kim UK, Kim JR, *et al.* Mandibular bone regeneration using autogenous skin-derived precursor cells with mixed demineralized bone and fibrin glue scaffold in miniature pigs. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2009;31:198-206.
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. 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.
23. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittlinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials* 2000;21:1145-53.
24. Schwarz N, Redl H, Schlag G, Schiesser A, Lintner F, Dinges HP, *et al.* The influence of fibrin sealant on demineralized bone matrix-dependent osteoinduction. A quantitative and qualitative study in rats. *Clin Orthop Relat Res* 1989;(238):282-7.
25. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, *et al.* Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:265-72.
26. Klöngnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:312-20.
27. Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, *et al.* Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:500-8.
28. Byun JH, Park BW, Kim JR, Lee JH. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors after mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:338-44.