

줄기 세포를 이용한 연골의 재생

Cartilage Repair Using Mesenchymal Stem Cells

민 병 현 | 아주의대 정형외과 | **Byoung-Hyun Min, MD**

Department of Orthopedic Surgery, Ajou University College of Medicine

E-mail : bhmin@ajou.ac.kr

이 현 정 | 아주의료원 세포치료센터 | **Hyun Jung Lee, PhD**

Cell Therapy Center, Ajou University Medical Center

김 영 직 | 아주의료원 세포치료센터 | **Young Jick Kim, PhD**

Cell Therapy Center, Ajou University Medical Center

J Korean Med Assoc 2009; 52(11): 1077 - 1089

Abstract

Articular cartilage defect rarely heals spontaneously due to its avascularity and low cellularity. Even small articular cartilage defects can develop into osteoarthritis, and subsequently, its management has been a major clinical concern. Although there are several treatment options for cartilage defect, no treatment has been established as a gold standard procedure. Bone marrow stimulation techniques which is equivalent to microfracture these days has been adapted as first line treatment, attributed to their technical easiness and minimal invasiveness to patients. However, this procedure has limitation in reproducing hyaline cartilage, so recent cell-based therapies using autologous chondrocytes or mesenchymal stem cells have drawn particular attention. MSCs regardless of its origin have shown significant potential for chondrogenesis. Novel approaches using MSCs as an alternative cell source for patient derived chondrocytes are currently on trial. In this review, stem cells from various origins considered as cell sources and potential application of mesenchymal stem cells to promote cartilage repair will be discussed. While differentiation of stem cell can be well controlled in vitro, it is not easy to predict the course of differentiation when the stem cell is transplanted. Some novel methods using physical stimulation and material based techniques for differentiation control are introduced in this context. Such differentiation control will be beneficial when it is adapted before transplantation. We call it preconditioning.

Keywords: Articular cartilage defect; Cell therapy; Stem cell; Differentiation; Precondition

핵심용어: 관절연골 손상; 세포치료; 줄기세포; 분화; 전처리

연골의 손상과 재생

연골은 혈관, 신경, 림프관이 없기 때문에 손상을 받은 후 세포를 보충할 수 있는 길이 매우 제한적이다. 연골 결손부위로 공급될 수 있는 세포에는 인근 연골로부터

이주(migration)하는 연골세포, 골수와 활막 및 지방 조직에 존재하는 줄기세포 등이 있다. 이 중 주위 연골로부터 이주한 연골세포는 이동 속도와 거리가 매우 제한적이기 때문에 연골 재생에 충분하지 않다. 한편 골수의 줄기세포는 전층 연골결손의 경우 연골의 재생에 참여할 수 있는 반면에,

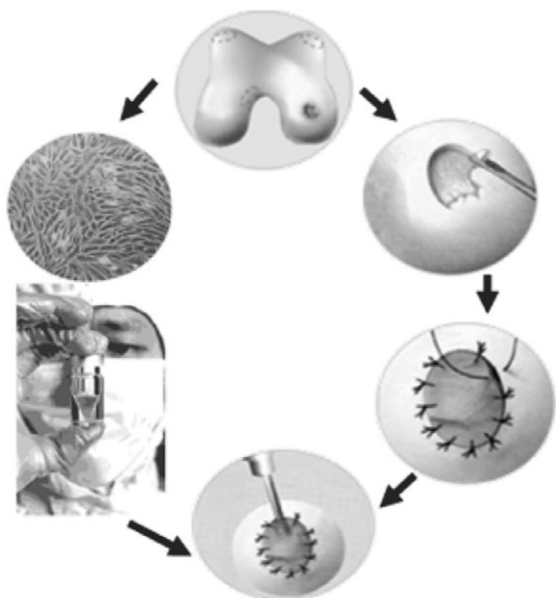


Figure 1. Schematic diagram of autologous chondrocytes implantation: 200~300 miligrams cartilage is sampled from a less loaded area and then chondrocytes are isolated enzymatically. Chondrocytes are grown in vitro until there are enough cells to implant on the defect area of the articular cartilage. Cultured chondrocytes are injected into the cavity constructed by damaged area and sutured periosteum.

부분층 결손인 경우에는 연골의 재생에 관여하기 어렵다. 한편 활막과 지방조직에 있는 줄기세포의 존재가 보고되고 있으나, 아직 이들이 연골의 자발적 재생에 참여하는지에 대해서는 충분한 근거가 제시되지 않고 있다. 이러한 특징 때문에 물리적 손상을 받은 연골은 다시 정상적인 기능과 구조를 가진 연골조직으로 재생되는 데 있어 많은 한계점을 지니고 있다.

또한 일단 손상된 연골의 경계 부위는 기계적 압력에 취약하여 쉽게 부서지고 마모되어 결손부위는 더 커지게 된다. 아울러 연골의 부스러기(debris)는 염증을 일으키는 원인을 제공함으로써 더욱 연골을 손상시키고, 그 결과 골관절염이 빠르게 진행될 수 있다. 따라서 손상된 연골을 조기에 재생 시켜주는 것이 매우 중요한데, 현재 연골 결손의 재생을 위한 방법이 다양하게 제시되고 있으나, 아직 정상적 초자 연골(hyaline cartilage)의 재생에는 미치지 못하고 있다.

1994년 M Brittberg에 의해 자가 연골세포 이식술(1)이

소개된 이래, 세포를 이용한 연골의 재생치료법이 급속히 발전하고 있다. 세포이식에 의한 연골의 재생치료 방법은 크게 나누어 결손된 부위에 세포를 공급하거나 인공적으로 배양된 관절연골을 이식하는 방법으로 구분할 수 있다.

세포를 이용한 연골의 재생

1. 자가 연골세포 이식술

(Autologous Chondrocytes Implantation, ACI)

자가 연골세포 이식술은 체외에서 배양된 세포의 이식을 통한 치료법 중 가장 먼저 임상적으로 적용된 방법으로, 1980년대 동물실험이 처음 시작되었고 1994년 Matts Brittberg가 24예의 임상 결과를 보고한 이후 현재까지도 널리 사용되고 있다(1~3). 이는 연골 결손 부위에 체외에서 배양된 자가 연골세포를 이식함으로써 연골조직의 재생을 유도하며, 중기 및 장기 추시 결과에서도 80% 이상의 비교적 높은 성공률이 보고되고 있어 현재 가장 널리 이용되고 있는 대표적인 치료법이다(4, 5).

자가 연골세포 이식술은 연골이 비교적 크게 결손된 부위에 적용이 가능하며, 아주 적은 양의 연골조직을 채취하기 때문에 공여부의 손상이 매우 적다. 이에 비해 환자 자신의 연골을 채취하기 위한 1차 관절경 수술과 이식을 하는 2번의 수술을 겪어야 하고 세포이식부위를 물샐 틈 없이 봉합해야 하므로 수술 난이도가 높고 적용 부위에 한계를 갖게 된다(관절의 후방부). 또한 4주간의 세포 배양기간을 필요로 하며 이식된 세포가 중력에 의해 한 방향으로 쏠리기 때문에 결손 부위에 균등하게 분포되기 어려운 단점이 있다.

(1) 시술 방법 및 임상 결과

접촉이 매우 적은 관절면에서 소량(200~300 mg)의 연골 조직을 채취한 후 이로부터 연골세포를 분리하여 세포가 500만개 이상 될 때까지 증식시킨다. 연골 채취 후 3~4주가 경과한 다음 이식 수술을 하는데 먼저 연골 결손 부위를 깨끗하게 다듬은 다음 이식 부위 아래에서 떼어낸 골막을 봉합한다. 봉합 후 생긴 빈 공간(cavity)에 증식된 연골 세포를 주사기로 주입한다(Figure 1, 2).

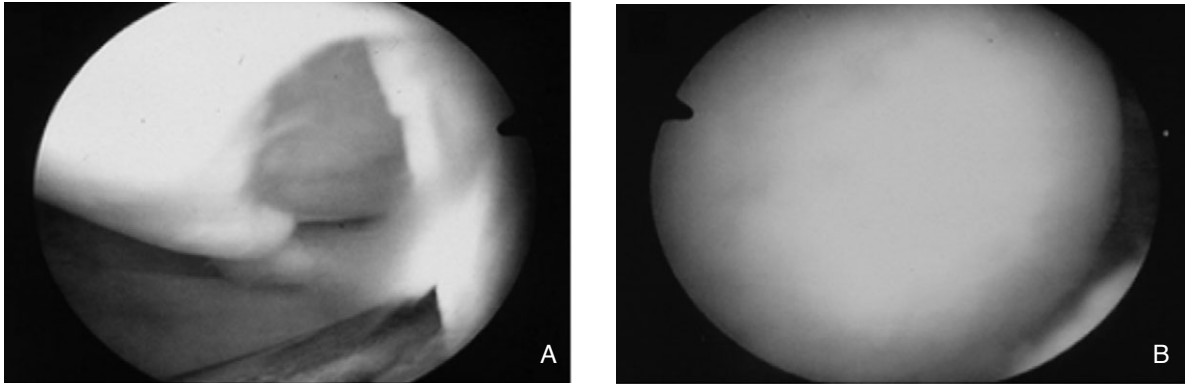


Figure 2. Arthroscopic finding: (A) Before operation, cartilage was detached from underlying subchondral bone (1.52 cm), (B) 1 year after autologous chondrocytes implantation, regenerated cartilage tissue showed normal appearance and was integrated well with neighboring normal cartilage.

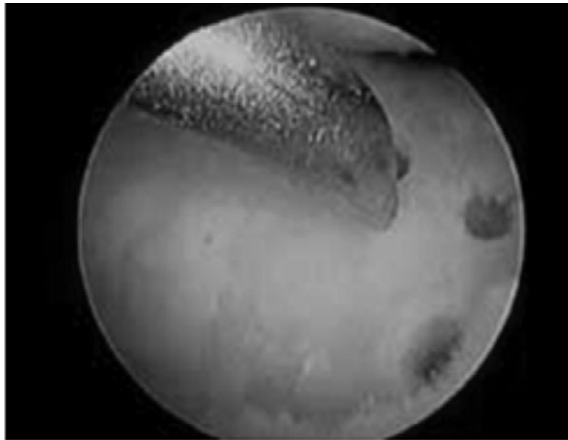


Figure 3. Arthroscopic view of microfracture procedure: Several holes were made on the subchondral bone with awl and each hole was apart from neighbor hole with regular distance. Blood clot drained from bone marrow includes mesenchymal stem cells and cytokine. Currently, microfracture has been accepted primary surgical option for full thickness articular cartilage defect.

2. 줄기세포를 이용한 연골 재생

(1) 골수의 줄기세포를 이용한 골수자극술

(Bone marrow stimulation technique)

골수자극술은 결손부위의 연골하골을 천공하거나 마모시켜 연골하부의 골수로부터 출혈을 유도함으로써 결손부위에 혈괴를 형성시키는 수술이다. 혈괴 내에는 골수에서 유래한 중간엽 줄기세포가 존재하므로 이 줄기세포가 주위

환경의 영향을 받아 연골세포로 분화되고 점차 연골조직을 형성하게 된다.

골수자극술은 수술 방법에 따라 골천공술(bone drilling), 마모성형술(abrasion arthroplasty), 미세골절술(microfracture)이 있는데, 1960년 골천공술이 시행된 이후 유행을 거듭하여 현재는 미세골절술이 가장 많이 쓰이고 있다. 골수자극을 하게 되면 어느 정도의 줄기세포가 유출되는데, 흥미로운 점은 수술 방법과 골수자극의 면적에 따라 유출되는 줄기세포의 수가 달라진다는 것이다. 즉 마모성형술은 골수자극의 범위가 가장 넓은 수술 방법으로 가장 많은 줄기세포를 유출시키고 골천공술은 가장 적은 줄기세포가 유출되며 골천공의 수가 많을수록 줄기세포의 유출이 많아지게 된다(6~9). 하지만 마모성형술은 연골의 결손 부위를 더 깊게 만들어 연골재생에 나쁜 영향을 줄 수도 있다. 따라서 최적의 골수자극술에 대한 연구가 필요할 것이다(Figure 3).

관절 내에는 적은 양이지만 활액이 존재하므로 골수자극술 후 형성된 혈괴는 쉽게 세척되거나, 하중에 의해 손실되기 쉽다. 또한 줄기세포가 주위의 연골조직이 아닌 활액에 의한 영향을 받아 결손부위가 정상 관절연골인 초차연골(hyaline cartilage)로 재생되기 보다는 섬유연골(fibrous cartilage)로 채워지는 경향이 있다. 섬유연골은 초차연골과는 달리 제 1형 교원질(type I collagen)이 주 성분이고, 단백질의 결합으로 비정상적인 물리적 내구력을 갖게 되어 수술 후 2년 정도까지는 60~70%의 증상 개선을 보이나 그 후에는 점점 나

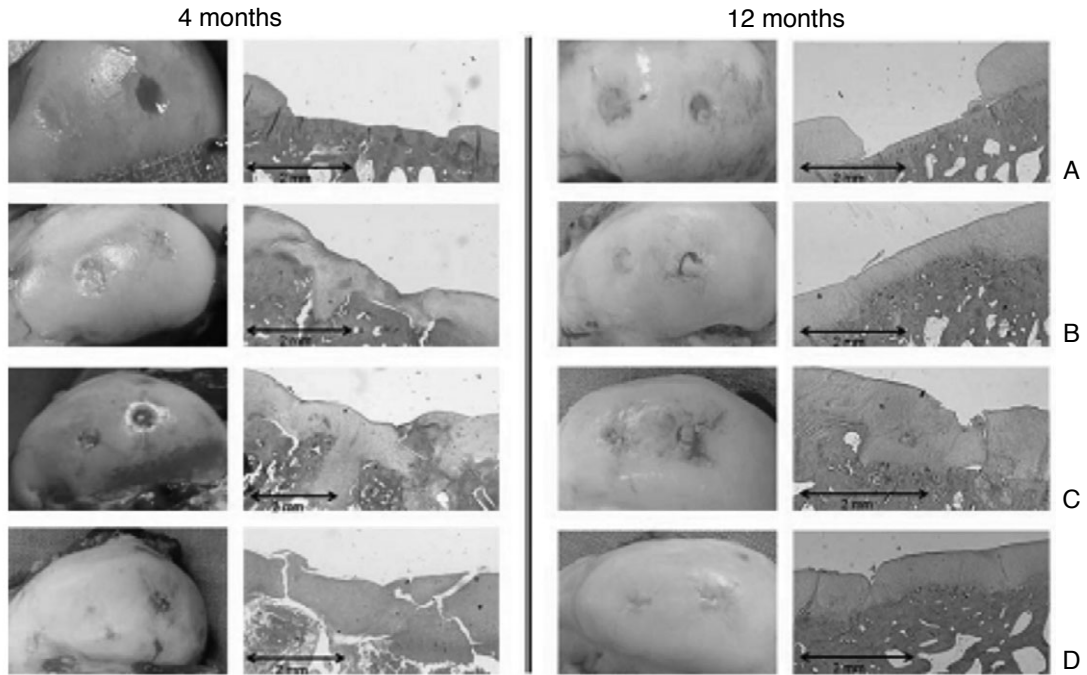


Figure 4. Gross and histological findings (H&E) of the defects at 4 and 12 months: untreated group in the first row (A), microfracture-treated group in the second row (B), unseeded matrix combined with microfracture in the third row (C), and microfracture with chondrocyte-augmented matrix in the fourth row (D). The defects in group 4 had the largest quantity of reparative tissue, achieving the level of the adjacent cartilage in some instances.

빠진다고 보고되고 있다. 따라서 이런 단점을 개선하고자 생체소재를 이용한 미세골절술이 개발되고 있다(Figure 4) (10~13).

앞서 기술된 바와 같이 미세골절술에 의해 유출된 혈피에는 줄기세포와 함께 성장인자와 같은 연골조직으로의 재생을 위한 성분들이 포함되어 있다. 이러한 성분들의 손실을 최대한 줄이고 줄기세포가 손상된 조직 내에서 정상과 같은 연골조직으로 분화되도록 유도하기 위해 교원질과 같은 생체재료를 이용한 방법들이 고안되고 있다. Breinan 등은 스폰지 형태의 미세골절술 후 제2형 교원질(type II collagen)로 제작된 sponge를 수술부위에 삽입함으로써 유출된 골수의 손실을 막고 연골조직으로의 분화를 유도하기 위한 환경을 제공하는 방법을 고안하였다(11). 또한 이러한 교원질 sponge에 연골세포를 집종하여 미세골절술 부위에 삽입하는 방법으로 기존의 골수자극술의 치료 효과를 높이고 있다(12, 13). 이들 수술법 모두 골수 유래 줄기세포 또는

연골세포가 연골조직으로 재생되기 위한 분화환경을 제공하여, 미세골절술 단독으로 진행된 방법에 비해 재생 정도가 월등히 향상된 결과를 보이고 있다.

3. 성체줄기세포의 이식을 이용한 연골 재생

자가 연골세포를 이용할 경우 세포를 채취하는 데 있어서 그 양이 매우 제한적이며, 체외 배양시 세포의 탈분화로 인해 세포 표현형의 변화가 발생하는 한계점을 가지고 있고(14~16), 동종세포를 이용할 경우에는 면역 거부 반응에 의한 실패가 예견되고 있다. 그러나 중간엽 줄기세포는 성인의 다양한 중간엽 조직에서 채취 가능하며, 여러번의 계대 배양 후에도 분화능을 유지하면서 증식이 가능하여 손상된 연골을 치료하기 위한 재생의학에 매우 중요한 세포원으로 주목받고 있다. 또한 손상이 깊어 연골하골까지 재생이 되어야 하는 경우, 연골 뿐 아니라 뼈로도 동시에 분화되어 재생되는 장점을 갖고 있기도 하다(Figure 5).

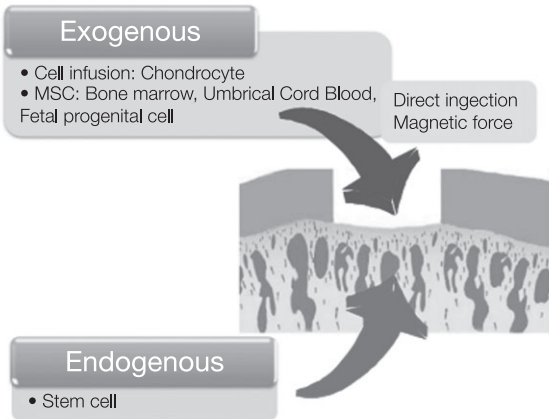


Figure 5. Methods to regenerate cartilage using various kinds of cell sources: Cartilage defect could be treated using inflow of endogenous stem cells into the defect area by the bone marrow stimulating technique or implantation of exogenous cells from various origins.

줄기세포는 면역반응이 없거나, 혹은 기존의 면역거부반응을 현저하게 저하시키는 기능이 있는 것으로 알려져 최근 동종의 줄기세포를 이용하여 연골재생에 적용하고자 하는 노력이 경주되고 있다.

하지만 줄기세포는 이식 후 세포비후와 관련된 유전자(hypertrophy-related genes)가 발현되어 세포 사멸과 함께 혈관 침투를 유발하여 결국 연골세포의 석회화를 초래하는 단점이 있다(17).

줄기세포는 채취부위에 따라 세포 수와 연골로의 분화능이 다른 것으로 보고되고 있으나, 임상적인 이용을 위해서는 잉여 세포를 이용하는 것이 매우 유리하므로 제대혈, 지방 조직, 혹은 활막 등으로부터 유래하는 줄기세포가 많이 연구되고 있다.

(1) 골수 유래 줄기세포

골수에 존재하는 중간엽 줄기세포는 가장 먼저 알려졌고, 오랫동안 연구되어 오면서 줄기세포 성질의 기준 세포(standard)로 간주되고 있다. 주로 장골능(ilic crest)에서 채취를 하며 특정 배양 조건에서 비교적 쉽고 재현성이 높게 뼈, 연골, 지방과 섬유세포로의 분화시킬 수 있어 연골재생을 위한 세포치료제의 세포 공급원으로써 가장 널리 이용되고 있다. 가장 먼저 연구가 시작된 만큼 다른 줄기세포와는 달리 임상적 연구가 이미 진행되고 있다. Wakitani는

2002년 24명의 환자에게 골수줄기세포를 이식한 이후 2004년 2명, 2007년 3명의 환자에게 골수줄기세포를 이식하였다(18~20). 2002년 보고는 세포운반체(cell-containing scaffold)에 줄기세포를 이식한 군과 세포가 없이 운반체만 이식한 군을 비교하였는데 임상적으로는 차이가 없었지만 관절경으로 관찰한 연골의 상태 및 재생된 연골의 조직학적 분석에서는 줄기세포를 이식한 군에서 우수한 결과를 보이고 있다. 2004년과 2007년에 시술한 환자는 모두 임상적으로 좋은 결과를 보였는데 불행하게도 비교군이 없었다.

현재 시술되고 있는 자가 연골세포 이식을 대체할 수 있는 가능성을 보기 위해 이를 비교한 보고가 있는데, 두 군간에 조직학적 점수(histological score)에서는 차이가 없었지만, 재생된 연골에서 줄기세포 이식군은 세포의 정렬(cell arrangement), 연골하골의 재형성(subchondral bone remodelling), 주위 골연골과의 융합(integration with surrounding bone and cartilage)에서 자가 연골세포 이식군보다 우수한 결과를 보이고 있다(21).

(2) 제대혈 줄기세포

제대혈은 기본적으로 골수이식 수술을 필요로 하는 모든 질병에 사용할 수 있고, 다른 조직에 비해 채취가 용이하고 윤리적인 문제를 피할 수 있기 때문에, 치료 목적의 좋은 세포 공급원이 될 수 있다. 골수 유래 줄기세포는 환자의 연령에 따라 분화능력에서 많은 차이를 보이나 제대혈 줄기세포는 연령에 크게 제한받지 않으며, 환자가 필요로 하면 언제든지 맞춤형 세포치료가 가능하다. 또한 다른 조직의 줄기세포에 비해 면역거부반응의 가능성이 매우 낮아 다양한 많은 환자들을 대상으로 치료를 할 수 있다는 점에서 상업적인 이용 가치가 매우 높다. 골수 유래 중간엽 줄기세포와 같은 분화능력을 가지고 있어 제대혈 줄기세포를 이용한 관절 연골 손상의 치료제가 국내외 여러 기업에서 제품으로 개발 중에 있다(22).

(3) 지방조직유래 줄기세포

지방조직유래 줄기세포는 인체의 어느 조직에서든지 쉽게 얻을 수 있다는 장점이 있다. 최근 들어 지방조직이 골수에 비해 더 많은 양의 줄기세포를 포함하고 있다고 보고되

고 있다(23). 우리 몸 어느 곳이나 존재하는 지방조직은 골수로부터의 수집에 비해 비교적 간단한 지방흡입 등으로 많은 양의 줄기세포를 얻을 수 있어 세포증식에 많은 시간이 소요되지 않으며, 공여부의 이환을 적게 남기고, 반복적으로 채취가 가능한 장점들을 가지고 있어 세포치료제의 재료로써 적합하다고 할 수 있다. 최근의 연구에 의하면 골 및 연골을 형성하는 능력이 골수기원의 간엽줄기세포에 비해 탁월한 효과를 보인다는 결과가 보고되고 있어 임상적인 유용성에 대해서도 기대가 되고 있다(24).

(4) 활막줄기세포

활막줄기세포는 관절강을 싸고 있는 활막의 표면을 덮고 있는 세포로 SDSC (synovial lining derived stem cells)로 불리고 있다. 다른 세포와는 달리 독특하게 높은 uridine diphosphoglucose dehydrogenase (UDPGD) 활성과 상대적으로 현저히 높은 CD44의 표현형 발현을 보이고 있기 때문에 연골세포로의 분화가 쉬운 세포로 알려져 있다. 또한 연골세포와 유사하게 cartilage oligomeric matrix protein (COMP), link protein 그리고 glycosaminoglycans (GAG)을 발현하고 있어서(25~27) 연골세포로의 쉬운 분화를 예견하게 하고 있다. 실제로 생체 내에서 활막줄기세포는 인근의 부분연골결손의 재생에 기여를 하는 것으로 보고된 바 있다(28). 활막줄기세포는 높은 재생능력을 가지고 있는데 관절 내에서 채취된 후에도 완벽하게 재생이 되며, 약 2주간의 배양만으로도 많은 수의 세포를 얻을 수 있다. 즉 평균 21,000 cells/mg의 세포를 얻을 수 있어(29) 소량의 조직 채취(punch biopsy)로 충분한 세포를 얻을 수 있다. 이러한 이유들 때문에 활막줄기세포는 연골재생을 위한 세포치료제와 조직공학 연구에서 우수한 효과를 보이고 있다(29~32). Peiyz은 최근 동종의 활막줄기세포로 제작된 미성숙 연골조직을 연골 전충결손에 이식하여 성공한 결과를 보고한 바 있다(33).

(5) 근육줄기세포

근육줄기세포는 성체줄기세포의 하나이며, 근육 손상시 근육조직의 재생에 관여하는 근육 위성세포(satellite cell) 중 일부분에서 분리된다. 근육 줄기세포의 특징은 ① 아주 빠르게 증식하여 세포 배양시 많은 양의 세포를 단시간 내

에 얻을 수 있으며, ② 바이러스나 기타 벡터 등으로 유전자 형질전이(transfection)가 용이하고, ③ 이식된 장기에서 골격근 근육섬유로 분화하면 아주 안정적으로 자리를 잡게 되어 세포이식, 장기이식에 적합하고, ④ 세포와 세포 접촉(cell to cell contact)시 근육섬유로 분화되어 성장이 멈춤으로써 암세포로 전환될 염려가 없어 최근 조직공학적 이용 가능성에 있어 각광을 받고 있다. 이러한 근육 줄기세포는 뼈, 연골, 지방, 인대, 근육 등으로 분화가 유도됨을 이미 확인하였고, 또한 뼈 형성 단백질-4 (BMP-4)를 생산하도록 유전자를 조작하여 관절염으로 연골 손상이 유발된 동물을 치료하는 데 성공하였다(34, 35).

(6) 기타 줄기세포

여러 조직으로부터의 줄기세포가 연골세포로 분화됨이 보고되면서 다양한 세포원으로 활용할 수 있다.

- Dermal fibroblasts (FBs): Junker 등은 피부에서 Dermal fibroblasts (FBs)를 채취하여 골, 연골, 지방 세포로의 분화를 입증하면서, 지방줄기세포와 비교할 수 있는 분화능을 가진 것을 보고하였다(36).

- Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (hUCMSCs): 탯줄로부터의 줄기세포가 연골세포로의 분화능을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 탯줄줄기세포는 폐기되는 조직을 활용하고 있으며 공여자에게 어떤 손상도 주지 않으면서 배양시 다른 줄기세포에 비해 비교적 오래동안 줄기세포 능력(self-renewal)을 보유하고 있다. 최근 Wang 등은 골수줄기세포에 비하여 탯줄줄기세포가 연골재생능이 뛰어난 점이 있음을 보고하고 있다.

4. 배아줄기세포를 이용한 연골 재생

배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)는 착상전 배반포(blastocyst)의 내세포괴(inner cell mass, ICM)를 분리하여 미분화 상태에서 배양 후 수립된 세포주이다. 즉 배아줄기세포는 분열은 활발하지만 아직 분화하지 않은 세포라 할 수 있다. 배아줄기세포는 체외에서 계대배양이 가능하며, 부유 배양하면 세포들이 서로 응집하여 embryoid bodies (EBs)라는 구상의 세포 덩어리를 형성한다. EBs는

배아(embryo)의 발생과 유사한 분화 양상을 나타내며 여러 형태로의 세포로 분화가 가능하다. 이러한 세포 분화 체계는 지방세포, 연골세포, 신경세포 등 여러 형태의 세포 분화 연구에 이용되고 있다. 미국 라이스 대학의 Kyriacos A. Athanasiou 교수팀은 인간 배아줄기세포에서 연골을 성장시키는 기술을 개발하여 임상적용에 있어 새로운 가능성을 제시하였다(37, 38).

줄기세포의 연골 분화에 있어서의 표현형 변화

연골 손상의 재생을 위한 중간엽 줄기세포의 임상적용을 위해서는 표현형 안정성(phenotypic stability)과 기능적인 적합성(functional suitability)이 보증되어야 한다. 현재까지 중간엽 줄기세포를 정의할 수 있는 단일 표지분자(marker molecules)는 없으므로 plastic adhesion에 의한 선택적 분리에 의해 얻어진 줄기세포를 이용하고 있으며, 이렇게 얻어진 세포는 굉장히 이질적인(heterogeneous mixture of cell) 상태의 세포집단이 된다(39, 40). 현재 많은 연구들에 의해 연골화 분화능력을 지닌 중간엽 줄기세포들이 정의되었고(41~44), 기내배양(in vitro)에서 연골분화를 유도하기 위한 표준화된 방법들이 정립되고 있다(45~48).

연골 조직의 분화 초기단계에 확인할 수 있는 발현 인자로는 SOX5, SOX6 그리고 SOX9이 대표적인 전사인자(transcription factor)로 널리 알려져 있으며, 이와 같은 연골분화에 필수적인 전사인자에 의해 연골세포로의 분화가 진행되어 연골 특이적인 세포외기질이 형성된다. 연골분화의 성숙 단계에서는 어그리칸(aggrecan), 데코린(decorin), 바이글리칸(biglycan)과 같은 당단백, 제2형 교원질과 콘드로이드헤린(chondroadherin)을 발현하며, 과분화 시에는 제10형 교원질이 발현하면서 골 형성이 유도되게 된다. 또한 Diaz-Romero 등은 연골조직에서 줄기세포의 특이적인 표면인자(surface marker)들을 관찰한 결과, CD14는 줄기세포에서는 발현되지 않으나 연골조직에서 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다(49).

또한 필자는 알지네이트를 이용한 삼차원적인 환경에서 연골화 분화과정 중 줄기세포 표면인자들의 변화 양상을 관찰한 결과, 줄기세포의 특이적인 표면인자들의 발현량이 감소하는 것을 확인하였다. 특히 CD44, CD58, CD81, CD90, CD105, CD166의 표면인자들은 중간엽 줄기세포에서 특이적인 양성(positive) 발현을 보이나, 삼차원 알지네이트 배양환경에서는 음성(negative) 발현 양상을 보였다. 또한 이들은 단층배양을 통한 탈분화 환경에서도 TGF- β 3의 전처리에 의해 오랫동안 음성 발현양상을 유지하였다. CD49c, CD49e, CD151 또한 중간엽 줄기세포에서 특이적인 양성 발현을 보이는 것으로 알려져 있는데, 연골화 분화에 필수적인 성장인자인 TGF- β 3의 처리에 의해 발현량이 감소하였다(50). 이러한 연구 결과들은 줄기세포와 연골세포의 특성을 나타내는 표지인자를 사용하여 줄기세포의 연골세포 분화 정도의 평가기준으로 적용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

줄기세포의 분화 조절

중간엽 줄기세포는 특별한 분화 환경에서 뼈, 연골, 근육, 지방, 건, 인대 그리고 신경 등의 다양한 조직으로 분화할 수 있는 잠재력을 지니고 있으나 이식된 후 원하는 조직으로 분화를 시키는 것은 쉽지 않은 일이다. 따라서 줄기세포를 이식한 후 원하는 조직으로 분화를 유도하기 위해 삼차원적인 배양 환경이나 성장인자 및 사이토카인(cytokines) 등 뿐만 아니라 기계적인 자극을 이용하여 이식 전에 분화 방향을 미리 조절하는(preconditioning) 전략이 필요할 수 있다(48, 52).

1. 생체재료를 이용한 줄기세포 분화 조절

줄기세포의 연골세포로의 분화를 위해서 제공되는 삼차원 환경에는 다양한 재료들이 사용된다. 알지네이트(alginate), 아가로스(agarose), 히알루론산(hyaluronan), 피브린(fibrin), 콜라겐(collagen)과 같은 다양한 천연 지지체나(53~67) polyglycolic acid (PGA), poly-(lactic acid) (PLA), poly-(lactic-co-glycolide acid (PLGA) 등과 같은

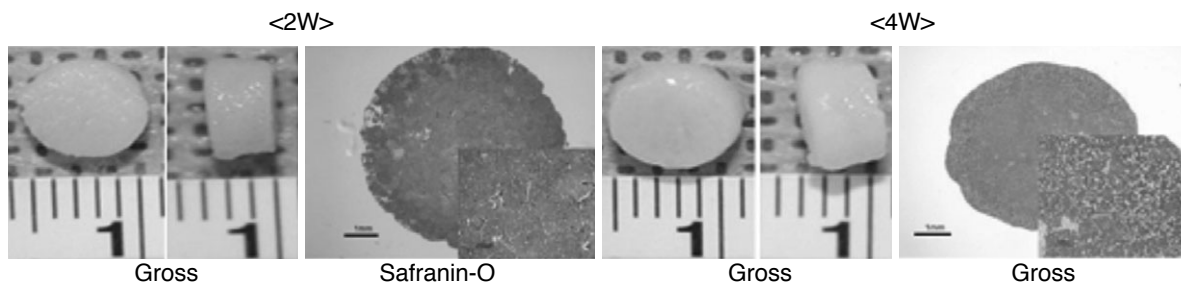


Figure 6. Artificial cartilage made by in vitro culture of chondrocytes seeded ECM scaffolds: Artificial cartilage looks grossly like hyaline cartilage since 2 weeks of culture. ECM distributed evenly over the scaffold at 2 weeks of culture in vitro. ECM of artificial cartilage was more increased and scaffold was degraded naturally at 4 weeks of culture.

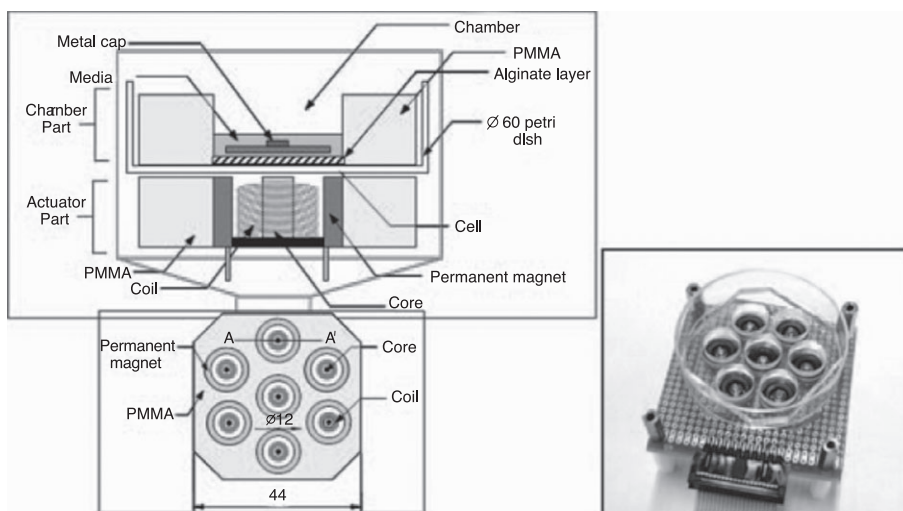


Figure 7. A novel cell stimulator based on the biological microelectromechanical system (BioMEMS) was manufactured to produce a cyclic compressive load (CCL) and applied to chondrogenic differentiation of MSCs. We could confirm the chondrogenesis of MSCs by mechanical stimulation with this system.

생분해성 고분자 합성 지지체에 줄기세포를 집중하여 체외 (in vitro)나 체내(in vivo)에서 연골세포로의 분화를 유도할 수 있다(68~71).

이러한 재료는 화학적 구조나 물리적 형태에 따라 줄기세포의 분화에 영향을 미칠 수 있다. 필자는 동물 연골세포의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 이용하여 다공성의 ECM 지지체를 제작한 후, 줄기세포가 연골세포로 분화하는 데 미치는 영향을 관찰하였다. 즉 토끼의 연골세포를 ECM 지지체에 집중하여 4주 동안 체외 배양하여 관찰한 결과, 조직학적 분석과 면역 염색에서 정상연골과 유사할

만큼 단백질당과 glycosaminoglycan (GAG)의 함량이 증가하였으며, 제2형 교원질(type II collagen)의 발현도 증가하였다. 이를 대표적인 합성 고분자인 PGA와 비교한 결과, PGA는 배양기간이 오래될수록 골 형성이 촉진되는 반면에 연골세포에서 분비된 세포외기질로 만들어진 ECM 지지체는 연골 형성능이 오랫동안 유지되고 있음을 확인하였다(51, 72, 73). 이와 같이 연골 특이적 ECM 지지체는 연골세포에 적합한 환경을 유지하고 있어, 줄기세포가 이식되었을 때 연골세포로 분화하고 연골의 세포외기질을 생성하는 데 탁월한 효과가 있는 것으로 짐작된다(Figure 6).

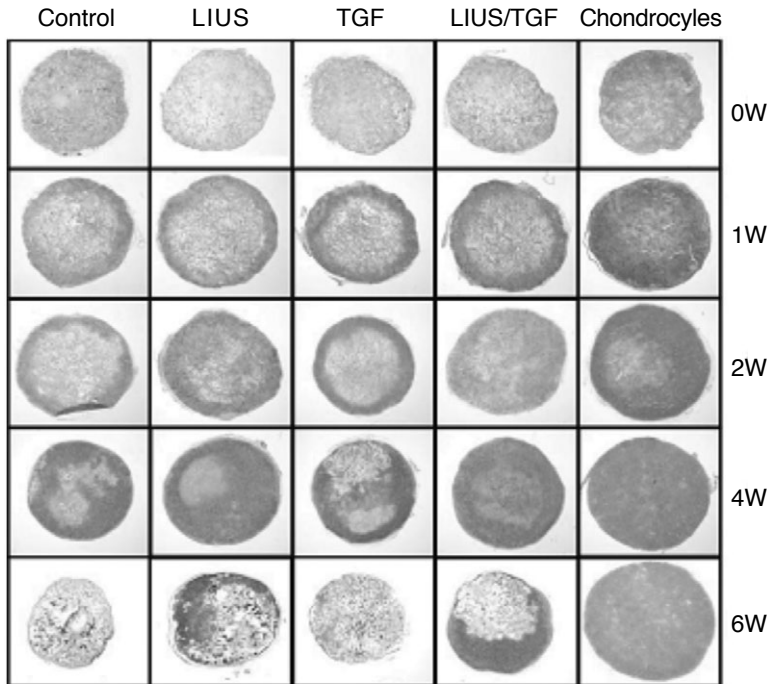


Figure 8. Effects low intensity ultrasound stimulation on the chondrogenic differentiation of MSCs: Low intensity ultrasound stimulator (LIUS) could maintain the phenotype of chondrocytes longer than control and TGF treated group under the 3-D cultural environment using PGA scaffold.

2. 기계적 자극을 이용한 줄기세포의 분화 조절

정상 연골조직은 항상 기계적 자극을 받는 환경에 있으며 기계적 자극이 없을시 쉽게 사멸하거나 정상 기능을 하지 못하는 것으로 알려져 있다. 연골은 발달 단계에서부터 물리/화학적 자극에 대한 연골세포의 반응과 연관되어 있다. 특히 관절운동(joint loading)시 발생하는 다양한 물리적 자극은 화학적 자극으로 전환되어 연골구조의 발생 및 유지에 중요한 영향을 미치게 된다(74, 75). 체외배양시 TGF- β , IGF 등과 같은 성장인자의 처리와 마찬가지로 compression, shear stress, stretch stress 등의 다양한 기계적 자극이 연골 조직 형성에 매우 효과적이다(71). 줄기세포의 연골 세포로의 분화에는 성장인자, 사이토카인, 산소 분압(O_2 tension), 영양소(nutrients)와 같은 생물학적인 조건의 변화가 이용되고 있으나, 소수의 연구에 의하면 생물학적 인자의 추가 없이 기계적 자극만으로도 분화를 일으킬 수 있다는 것이 알려져 있다(76, 77).

실험실에서 기계적 자극은 대부분 수압에 의한 자극(water-generated stimulation)이 사용되는데, 그 외에 원심력에 의한 자극도 사용될 수 있고, 혹은 초음파에 의한 자극이 사용되기도 한다. Angele 등은 주기적 수압(cyclic hydrostatic pressure)으로 인간의 중간엽 줄기세포의 연골분화를 증진시켰으며 Takahashi 등은 쥐 배아의 중간엽세포에서 압축력을 줌으로써 SOX9, 제2형 교원질, aggrecan의 합성을 증가시키고, IL-1beta의 발현을 억제시킬 수 있었다고 보고한 바 있다(78~80). 필자는 MEMS (micro electromechanical systems)라는 초소형 전자기계를 이용한 주기적 압축력을 가함으로써 성장인자의 첨가없이 줄기세포의 연골세포로의 분화를 성공한 바 있다(Figure 7) (81, 82).

필자는 저강도 초음파로 기계적 자극을 주어 중간엽 줄기세포의 연골세포 분화 유도에 처음으로 성공한 바 있다(52, 68). 삼차원 지지체로 알지네이트를 이용한 삼차원 배양시 저강도 초음파 자극을 주어 연골세포로의 분화를 유도한 뒤, 다시 단층배양(monolayer culture)을 하여 탈분화(dedifferentiation)를 유도한 결과 초음파 처리된 세포들은 연골 분화 환경이 아님에도 불구하고 연골 세포의 표현형을 오랫동안 유지하는 것을 확인하였다. 이는 체내 분화 결과에서도 마찬가지로 PGA 삼차원 환경에서 중간엽 줄기세포 배양시 저강도 초음파를 1주 동안 전처리한 결과 연골조직의 표현형을 계속 유지하였다(Figure 8).

3. 줄기세포의 전처리(Preconditioning)

이와 같은 기계적 자극은 안전성이 높아 이식시에 응용하는데 큰 장점이 있다(83~90). 즉 줄기세포를 이식전, 즉 배양 상태에서 기계적 자극으로 처리하여 연골세포로의 분화 방향을 설정할 수 있다거나, 혹은 이식한 후 기계적 자극으

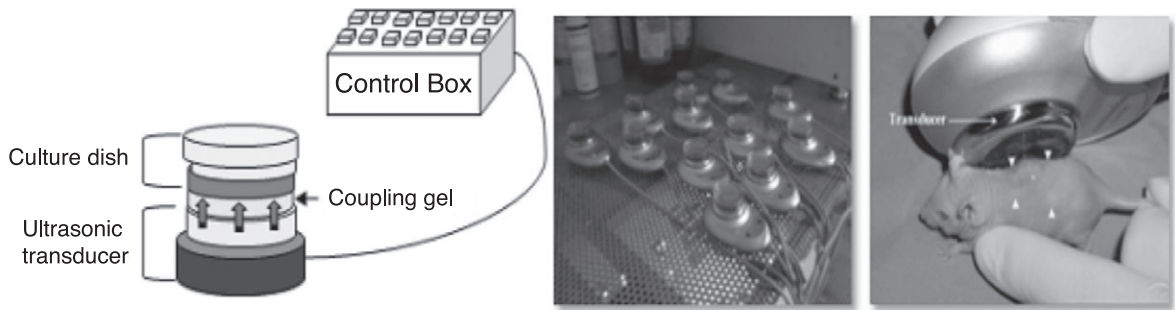


Figure 9. A system for promoting the chondrogenic differentiation of MSCs using LIUS.

로 줄기세포가 연골세포로 분화될 수 있다면 매우 높은 이식 성공률을 보이게 될 것이다.

필자는 PGA/중간엽 줄기세포의 조직을 생체 내로 이식하기 이전에 생체의 배양에서 초음파를 전처리하여 마우스에 이식한 결과, 초음파 전처리 그룹은 대조군에 비해 골화 분화가 지연되면서 연골화 분화 정도를 오랫동안 유지하고 있는 것을 확인하였다. 또한 PGA/중간엽 줄기세포의 조직을 누드 마우스에 이식하여 저장도 초음파로 자극한 결과 저장도 초음파 처리 그룹에서 글라이코사미노글라이칸(glycosaminoglycan)과 콜라겐 양이 대조군에 비해 크게 증가함을 확인하였다. 또한 초음파 처리시 조직의 압축 강도(compressive strength)가 증가함을 관찰하였다 (Figure 9)(48, 52).

결 언

줄기세포는 많은 세포원(cell source)이 있으며, 표현형이 변화되지 않으면서 증식을 할 수 있는 세포로 연골조직의 재생에 있어서 매우 매력적인 세포이다. 더욱이 이식 후 면역거부반응을 보이지 않아 동종의 세포치료제 혹은 배양 조직 이식으로의 가능성이 열리고 있다.

그러나 줄기세포의 단일 표지자(monoclonal marker)가 없으므로 해서 균질적인 세포를 효과적으로 얻을 수 없고 계대 배양시 줄기세포능(stemness)을 상실하는 경향이 있어 효과적인 이용을 위해서는 적절한 기술의 개발이 필요하다. 무엇보다 줄기세포의 배양시 다양한 분화능이 보고되고

있지만 이식 후 원하는 조직으로의 분화 조절 기술이 충분치 않아 이에 대한 많은 연구가 필요하다. 이러한 이유들로 인해 줄기세포는 아직 임상적 이용에 있어서 매우 초보단계에 있으나, 줄기세포능을 보유한 세포집단의 발견, 배양 기술의 발달과 함께 생물학적 인자, 물리적 자극 등으로 연골세포로의 분화를 조절하는 기술이 개발되고 있으며 또한 우수한 세포전달체 혹은 지지체(cell delivery vehicle or scaffold)가 개발되고 있어 줄기세포의 미래는 매우 밝다고 할 수 있다.

참고문헌

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-895.
2. Peterson L, Menche D, Grande D, Klein M, Burmester G, Pugh J, Pitman M. Chondrocyte transplantation-an experimental model in the rabbit. *Trans Orthop Res Soc* 1984; 9: 218.
3. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 1989; 7: 208-218.
4. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 374: 212-234.
5. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(S2): 17-24.
6. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo J. The microfracture procedure: rationale, technique, and clinical observations for treatment of articular cartilage defects. *J Sports Traumatol Relat Res* 1998; 20: 61-70.

7. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med* 2009; Feb 26. [Epub ahead of print]
8. Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, Shive MS, Buschmann MD. Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J Orthop Res* 2009; Apr 28. [Epub ahead of print].
9. Mori S. Bone fracture and the healing mechanisms. *Microdamage and microfracture*. *Clin Calcium* 2009; 19: 699-703.
10. Kang SW, Bada LP, Kang CS, Lee JS, Kim CH, Park JH, Kim BS. Articular cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid. *Biotechnol Lett* 2008; 30: 435-439.
11. Breinan HA, Martin SD, Hsu HP, Spector M. Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res* 2000; 18: 781-789.
12. Kramer J, Bohrnson F, Lindner U, Behrens P, Schlenke P, Rohwedel J. In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 616-626.
13. Dorotka R, Bindreiter U, Macfelda K, Windberger U, Nehrer S. Marrow stimulation and chondrocyte transplantation using a collagen matrix for cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 655-664.
14. Khang G, Kim SH, Kim MS, Rhee JM, Lee HB. Recent and future directions of stem cells for the application of regenerative medicine. *Tissue Eng Regen Med* 2007; 4: 441-470.
15. Min B-H, Kim HJ, Lim H, Park CS, Park SR. Effects of ageing and arthritic disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med* 2001; 33: 299-302.
16. Kim HJ, Park SR, Park HJ, Choi BH, Min B-H. Potential predictive markers for proliferative capacity of cultured human articular chondrocytes: PCNA and p21. *Artificial Organs* 2005; 29: 393-398.
17. De Bari C, Dell'occhio F, Luyten FP. Failure of in vitro differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 142-150.
18. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous cultured expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 199-206.
19. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, Toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant* 2004; 13: 595-600.
20. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patellofemoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1: 74-79.
21. Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 2007; 23: 178-187.
22. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242.
23. Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 418-429.
24. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 845-853.
25. Recklies AD, Baillargeon L, White C. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 997-1006.
26. Fife RS, Catterson B, Myers SL. Identification of link proteins in canine synovial cell cultures and canine articular cartilage. *J Cell Biol* 1985; 100: 1050-1055.
27. Hamerman D, Smith C, Keiser HD, Craig R. Glycosaminoglycans produced by human synovial cell cultures. *Coll Relat Res* 1982; 2: 313-329.
28. Miyamoto A, Deie M, Yamasaki T, Nakamae A, Shinomiya R, Adachi N, Ochi M. The role of the synovium in repairing cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007; 15: 1083-1093.
29. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2521-2529.
30. Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 843-853.
31. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 2006; 97: 84-87.
32. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007; 327: 449-462.
33. Peiyz M, Heyz F, Boycey BM, Kishy VL. Repair of full-thickness femoral condyle cartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissue constructs. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 714-722.
34. Matsumoto T, Kubo S, Meszaros LB, Corsi KA, Cooper GM, Li G, Usas A, Osawa A, Fu FH, Huard J. The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells: implications for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3809-3819.
35. Goldring MB. Are bone morphogenetic proteins effective inducers of cartilage repair? Ex vivo transduction of muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 387-389.
36. Junker JP, Sommar P, Skog M, Johnson H, Kratz G. Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Clonally Derived Human Dermal Fibroblasts. *Cells Tissues Organs* 2009; Jul 28. [Epub ahead of print]
37. Hoben GM, Willard VP, Athanasios KA. Fibrochondrogenesis of hESCs: growth factor combinations and cocultures. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 283-292.
38. Koay EJ, Athanasios KA. Development of Serum-Free, Chemically Defined Conditions for Human Embryonic Stem Cell-Derived Fibrochondrogenesis. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 2249-2257.



39. Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 2000; 185: 98-106.
40. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived Mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238: 265-272.
41. Elvenes J, Knutsen G, Johansen O, Moe BT, Martinez I. Development of a new method to harvest chondroprogenitor cells from underneath cartilage defects in the knees. *J Orthop Sci* 2009; 14: 410-417.
42. Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R85.
43. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Stern-Straeter J, Bran G, Hömann K, Riedel F. Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation. *Int J Mol Med* 2008; 21: 271-279.
44. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1522-1532.
45. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009; Mar 31. [Epub ahead of print]
46. Van Osch GJ, Van Der Veen SW, Burger EH, Verwoerd-Verhoef HL. Chondrogenic potential of in vitro multiplied rabbit perichondrium cells cultured in alginate beads in defined medium. *Tissue Eng* 2000; 6: 321-330.
47. Wiesmann A, Buhning HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med* 2006; 2: 8.
48. Lee HJ, Chio BH, Min B-H, Park SR. Effects of low intensity ultrasound pretreatment on the chondrogenesis of rabbit mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Regen Med* 2005; 2: 50-54.
49. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nestic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol* 2005; 202: 731-742.
50. Lee HJ, Choi BH, Min B-H, Park SR. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. *Arthritis & Rheumatism* 2009; 60: 2325-2332.
51. Jin RL, Park SR, Choi BH, Min B-H. Scaffold-free cartilage fabrication system using passaged porcine chondrocytes and basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 1887-1895.
52. Cui JH, Park SR, Park K, Choi BH, Min B-H. Preconditioning of mesenchymal stem cells with low-intensity ultrasound for cartilage formation in vivo. *Tissue Eng* 2007; 13: 351-360.
53. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79: 831-836.
54. Marlovits S, Striessnig G, Kutscha-Lissberg F, Resinger C, Aldrian SM, Vécsei V, Trattnig S. Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005; 13: 451-457.
55. Funayama A, Niki Y, Matsumoto H, Maeno S, Yatabe T, Morioka H, Yanagimoto S, Taguchi T, Tanaka J, Toyama Y. Repair of full-thickness articular cartilage defects using injectable type II collagen gel embedded with cultured chondrocytes in a rabbit model. *J Orthop Sci* 2008; 13: 225-232.
56. Van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP. Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 1999; 20: 1167-1175.
57. Kim M, Shin Y, Hong B, Kim YJ, Chun JS, Tae G, Kim YH. In vitro chondrocyte culture in a heparin-based hydrogel for cartilage regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; Mar 27. [Epub ahead of print]
58. Zheng L, Sun J, Chen X, Wang G, Jiang B, Fan H, Zhang X. In vivo cartilage engineering with collagen hydrogel and allogeneous chondrocytes after diffusion chamber implantation in immunocompetent host. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 2145-2153.
59. Park S-H, Park SR, Chung SI, Pai KS, Min B-H. Tissue-engineered cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation. *Artificial organs* 2005; 29: 838-860.
60. Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI, Shino K, Ochi T. Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand* 1998; 69: 56-62.
61. Homminga GN, Buma P, Koot HW, van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand* 1993; 64: 441-445.
62. Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 2000; 16: 571-577.
63. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 2671-2686.
64. Kim JK, Lee JS, Jung HJ, Cho JH, Heo JI, Chang YH. Preparation and properties of collagen/modified hyaluronic acid hydrogel for biomedical application. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7: 3852-3856.
65. Marsich E, Borgogna M, Donati I, Mozetic P, Strand BL, Salvador SG, Vittur F, Paoletti S. Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: a bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84: 364-376.
66. Park S-H, Cui JH, Park SR, Min B-H. Potential of fortified fibrin/hyaluronic acid composite gel as a cell delivery vehicle for chondrocytes. *Artificial organs* 2009; 33: 439-447.
67. Kim HJ, Kim U-J, Vunjak-Novakovic G, Min B-H, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 2005; 26: 4442-4452.
68. Cui JH, Park K, Park SR, Min B-H. Effects of low-intensity ultrasound on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells embedded in polyglycolic acid: an in vivo study. *Tissue Eng* 2006; 12: 75-82.
69. Lohmann CH, Schwartz Z, Niederauer GG, Carnes DL Jr, Dean DD, Boyan BD. Pretreatment with platelet derived growth factor-BB modulates the ability of costochondral resting zone chondrocytes incorporated into PLA/PGA scaffolds to form new cartilage in vivo. *Biomaterials* 2000; 21: 49-61.
70. Xin X, Hussain M, Mao JJ. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials* 2007; 28: 316-325.

71. Park K, Cho KJ, Kim JJ, Kim IH, Han DK. Functional PLGA scaffolds for chondrogenesis of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Macromol Biosci* 2009; 9: 221-229
72. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Park KD, Min B-H. In vivo cartilage tissue engineering using a cell-derived extracellular matrix scaffold. *Artif Organs* 2007; 31: 183-192.
73. Jin CZ, Choi BH, Park SR, Min B-H. Cartilage engineering using cell-derived extracellular matrix scaffold in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2009; May 12. [Epub ahead of print]
74. Mobasheri A, Carter SD, Martin-Vasallo P, Shakibaei M. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int* 2002; 26: 1-18.
75. Williams GM, Klisch SM, Sah RL. Bioengineering cartilage growth, maturation, and form. *Pediatr Res* 2008; 63(5): 527-534.
76. Park SR, Min B-H, Park S-H, Lee HJ. Application of mechanical stimulation for chondrogenesis. *Tissue Eng Regen Med* 2005; 2: 77-85.
77. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 80-86.
78. Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, Fuchtmeyer B, Nerlich M, Neumann C, Kujat R. Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Bio-rheology* 2004; 41: 335-346.
79. Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, Johnstone B. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 2003; 21: 451-157.
80. Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, Tanaka O, Semba I, Dashner R, Shum L, Slavkin HC. Compressive force promotes SOX9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 14): 2067-2076.
81. Park S-H, Sim WY, Park SW, Yang SS, Choi BH, Park SR, Park K, Min B-H. An electromagnetic compressive force by cell exciter stimulates chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 3107-3117.
82. Sim WY, Park SW, Park S-H, Min B-H, Park SR, Yang SS. A pneumatic micro cell chip for the differentiation of human mesenchymal stem cells under mechanical stimulation. *Lab chip* 2007; 7: 1775-1782.
83. Park SR, Choi BH, Min B-H. Low-intensity ultrasound as an innovative tool for chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Organogenesis* 2007; 3: 74-78.
84. Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005; 4: 255-260.
85. Choi BH, Woo J-I, Min B-H, Park SR. Low-intensity ultrasound stimulates the viability and matrix gene expression of human articular chondrocytes in alginate bead culture. *J Biomed Mater Res A* 2006; 79: 858-864.
86. Park SR, Park S-H, Jang KW, Cho HS, Cui JH, An HJ, Choi MJ, Chung SI, Min B-H. The effect of sonication on simulated osteoarthritis Part II: alleviation of osteoarthritis pathogenesis by 1 MHz ultrasound with simultaneous hyaluronate injection. *Ultrasound Med Biol* 2005; 31: 1559-1566.
87. Park SR, Jang KW, Park S-H, Cho HS, Jin CZ, Choi MJ, Chung SI, Min B-H. The effect of sonication on simulated osteoarthritis Part I: effects of 1 MHz ultrasound on uptake of hyaluronan into the rabbit synovium. *Ultrasound Med Biol* 2005; 31: 1551-1558.
88. Lee HJ, Choi BH, Min B-H, Park SR. Low-intensity ultrasound inhibits apoptosis and enhances viability of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate culture during chondrogenic differentiation. *Tissue Eng* 2007; 13: 1049-1057.
89. Min B-H, Woo J-I, Cho H-S, Choi BH, Park S-J, Choi MJ, Park SR. Effects of low-intensity ultrasound stimulation of human cartilage explants. *Scand J Rheumatol* 2006; 35: 305-311.
90. Choi BH, Choi MH, Kwak MG, Min BH, Woo ZH, Park SR. Mechanotransduction pathways of low-intensity ultrasound in C-28/I2 human chondrocyte cell line. *Proc Inst Mech Eng H* 2007; 221: 527-535.



Peer Reviewers' Commentary

본 논문은 관절 연골 손상의 재생 방법으로 세포 치료법에 대한 현 주소를 소개하고 있다. 관절 연골 손상의 경우 골관절염으로 진행되어 노령화 사회에서 삶의 질에 많은 영향을 미치게 되는 질환으로 이에 대한 치료법은 근골격계 분야에서 아주 큰 비중을 차지하고 있다고 할 수 있다. 이에 대한 생물학적, 그리고 기능적인 회복을 위하여 연골세포, 골수 유래 줄기세포, 지방조직유래 줄기세포, 체대혈 줄기세포, 배아 줄기세포를 이용한 치료 방법에 대한 장단점 및 해결해야 할 과제 등에 대한 문헌 고찰과 필자들의 결과를 소개하고 있다. 또한 세포 이식만을 시행할 경우 발생하는 여러 가지 단점의 극복을 위한 해결책으로 생체 재료의 활용과 이식 전 세포에 대한 preconditioning의 개념 도입 등에 대하여 소개하면서 필자들의 초음파를 이용한 연골 분화의 촉진과 이식 세포-생체 재료 복합체의 효과 극대화의 방법을 제시하고 있다. 줄기세포를 이용한 관절 연골의 재생 방법은 기존의 치료 방법의 한계를 극복할 수 있는 미래지향적인 치료 방법으로 향후 국민 보건에의 향상 뿐만 아니라 보건 산업적인 측면에서 그 효과가 지대하다는 점을 밝히고 싶다. 그런 측면에서 본 논문은 향후 치료 및 연구 방향에 대한 포괄적 서술과 함께 가이드라인을 제시하고 있다는 점에서 더욱 큰 의미가 있다고 할 수 있다.

[정리: 편집위원회]