

# 재조합 BMP-7 유전자가 전달된 HEK 293 세포에 의한 누드 마우스에서의 뼈형성

영남대학교 의과대학 해부학교실, 생화학·분자생물학교실\* 정형외과학교실<sup>†</sup>  
정수연·장원태·장연실\*·안면환<sup>†</sup>·김재룡\*·송인환

## Bone Formation by rhBMP-7 Transduced HEK 293 Cells in Nude Mouse

Su-Yon Jeong, Won-Tae Chang, Yon-Sil Chang\*,  
Myun-Hwan Ahn<sup>†</sup>, Jae-Ryong Kim\*, In-Hwan Song

*Department of Anatomy, Biochemistry·Molecular biology\*, Orthopedic surgery<sup>†</sup>  
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

### —Abstract—

To induce bone formation at ectopic site by tissue engineering and gene therapy, we transplanted collagen sponges containing rhBMP-7 transduced HEK 293 cells in the hypodermis of nude mice. Bone formation was investigated by histological and electron microscopic method at 3, 6, and 9 weeks after transplantation.

At 9 weeks after transplantation, eosinophilic bony tissue was observed in the implanted collagen sponge and was confirmed as bone tissue by Von Kossa stain. In the transmission electron microscopic observation, the cells in newly formed bone tissue had eccentrically located nucleus and well developed rough endoplasmic reticulum (rER). Therefore, the cells were evaluated as osteoblasts.

Those results suggest that it is possible to form a bone tissue in the ectopic site by transplantation of rhBMP-7 transduced HEK 293 cells. This will be contributed to push more advanced gene therapy for bone formation. However, the HEK 293 cell is unable to apply to the clinical gene therapy. Therefore it is worth to find more compatible cells for clinical application. In addition, collagen sponge is considered as an excellent scaffold and/or carrier for gene therapy and a good biomaterial for tissue engineering.

**Key Words:** BMP-7, Osteoinduction, Collagen sponge

## 서 론

골절이나 골다공증 및 기타 원인에 의한 뼈 손상의 치유과정에서 반드시 수반되는 뼈재생 과정에 관련하여 지금까지 많은 연구가 이루어졌으며 뼈형성에 영향을 미치는 여러가지 요인 및 인자들의 기전에 대해서도 많은 정보들을 수집하게 되었다. 그 중에서도 뼈형성단백질(BMPs : Bone Morphogenetic Proteins)은 태생기의 뼈형성 과정에 깊이 관여할 뿐 아니라 뼈손상 시의 치유속도에도 지대한 영향을 미치는 것으로 알려졌다(1). BMPs는 TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) superfamily에 속하는 성장인자들로서, 현재까지 밝혀진 바로는 BMP-1에서 BMP-15까지 총 15 종류의 BMPs로 구분할 수 있으며, 이들은 다시 염기서열의 유사성에 따라 다시 몇 개의 subfamily group으로 분류할 수 있다(2-5). BMP-1은 뼈형성 유도에는 관여하지 않는 것으로 밝혀져 BMP family에서 제외되었으며, 일부의 BMPs들은 뼈조직 형성 및 손상된 뼈의 재생을 유도하는 데에 있어서 지배적인 역할을 한다. 특히, BMP-2, 3, 4, 6, 7, 9는 뼈조직의 형성을 적극적으로 유도하는데(4,6), 염기서열에서 서로 높은 유사성을 가지는 BMP-2와 BMP-4는(7) 골절 시 치유과정의 초기에 다량 발현되어 연골의 골화 및 가골 형성을 자극함으로써 뼈조직의 재생을 유발하고(8,9), 나머지 BMPs들은 어느 시기에 특징적으로 다량 발현되는지 정확히 밝혀진 바는 없으나 현재까지는 뼈조직 형성과정 전반에 걸쳐 발현되면서 뼈조직의 재건을 돕는 것으로

알려졌다. BMP-7은 osteogenic protein-1 (OP-1)이라고도 불리는데 BMP-2, 4와는 염기서열에서 약간의 차이를 나타내어 BMP family의 다른 subgroup으로서 BMP-2, 4와는 발현량이나 시기에 있어서 다른 경향으로 뼈재생에 적극적으로 참여할 뿐 아니라, BMP-7으로 형질도입된 공여세포와 숙주조직의 상호작용과는 무관하게 비골아세포(nonosteoblast)에서 골아세포(osteoblast)로의 전환을 유도한다(10). 이 사실은 뼈형성 유도를 위한 BMP-7의 유전자 치료법 등의 임상적인 응용에 있어서 매우 유용한 것으로 종양조직의 절제로 인한 조직의 소멸 혹은 방사선치료 등의 이유로 인해 뼈세포의 분화가능성이 있는 세포들이 전혀 존재하지 않을 경우에도 충분히 골성 세포의 유발을 촉진시킬 수 있다는 근거가 된다(11).

조직 공학의 점층적인 발달로 인해 최근에는 뼈형성을 유도하는 인자들을 생체조직에 적합한 운반체에 유입시켜 뼈 손상부위에 직접 이식하는 것이 가능하게 되었다. 이러한 운반체로는 여러 가지 물질이 시도되었는데, type I collagen은 생체에 적용했을 때 비교적 안전성이 뛰어나고, 생체조직에 대한 적합성이 우수하여 이식후 쉽게 숙주조직에 흡수되는 이점이 있으며, 또한 collagen 자체가 뼈전도 유도물질로서의 역할도 하므로 운반체로서의 장점을 충분히 지니고 있는 생물학적 재료라고 할 수 있다(3,12). 뼈손상에 대한 치료법으로서, 뼈형성을 유도하기 위한 조직공학적 접근법으로 다양한 유전자 요법, 세포 요법이 제시되었는데, 최근에는 이들 방법을 상호 보완하여 뼈

형성 유전자로 형질도입한 세포를 필요한 곳에 이식하는 방법(ex vivo gene therapy)이 시도되고 있다(2).

이러한 이전의 연구결과들을 바탕으로 본 실험에서는 유전자치료법과 조직공학적 방법을 응용하여 누드마우스에서의 뼈형성을 유도하고자 하였다. 재조합 BMP-7 유전자가 전달된 HEK 293세포와 사람섬유모세포를 type I collagen 용액과 함께 배양하여 collagen sponge를 제작하고 이를 누드마우스의 피하에 이식하여 뼈형성이 되는지를 조직검사와 전자현미경 관찰 등으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

실험동물은 중앙실험동물사로부터 공급받은 9~10주령의 BALB/c-nu계의 수컷 누드마우스 12마리를 사용하였다. Dullbecco's modified Eagles media (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), antibiotic-antimycotics, trypsin-EDTA 등의 세포배양 시약은 Gibco (USA)에서 fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone (Australia) 으로부터 구입하였다. 전자현미경 표본제작에 사용한 Epon 812, uranyl acetate, lead citrate 등은 Poly Science (USA)에서 구입하였고 이외의 염색시약을 비롯한 일반시약들은 Sigma (USA)의 것을 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 세포배양

HEK 293세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 일반적인 조건에서 배양하였다. 사람섬유모세포는 10~12세 남아의 음경겹질에서

분리배양 하였다. 사람피부를 잘게 잘라 배양액을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 4~5일 후 배양용기로 자라나온 섬유모세포를 수확하여 증식시켰다. 본 실험에는 5~6계대의 세포를 사용하였다.

#### 2) HEK 293 세포에서 유전자 재조합 BMP7의 발현

HEK 293 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 일반적인 조건에서 배양하였다. pcDNA/BMP7 재조합 플라스미드를 LipofectAMINE 2000 (Life Technologies사, USA)을 사용하여 HEK 293 세포에 형질도입(transfection) 시켰다. 먼저 직경 35 mm 세포 배양 용기에  $1 \times 10^6$  개의 세포를 넣고 배양하였다. 멸균된 미세 원심분리관에 100  $\mu$ l Opti-MEM (Gibco-BRL, USA)과 5  $\mu$ l LipofectAMINE 2000 (Gibco-BRL, USA)을, 다른 원심분리관에 100  $\mu$ l Opti-MEM (Gibco-BRL, USA)과 1  $\mu$ g 플라스미드 DNA를 넣고 실온에서 5분간 방치하였다. 두 용액을 혼합한 후, 30분간 실온에서 반응시켜 DNA-liposome 복합체가 생성되도록 하였다. 그리고 HEK 293 세포를 항생제가 없는 DMEM+10% FBS로 한번 세척하고, 0.8 ml의 DMEM+10% FBS를 첨가하였다. 200  $\mu$ l의 DNA-liposome 복합체를 세포 배양용기에 첨가하고 잘 흔들어 준 후, 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 하루 밤 동안 배양하였다. 배양액을 항생제와 100  $\mu$ g/ml G418이 첨가된 DMEM +10% FBS 용액으로 교체한 후 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하여, G418에 내성인 세포들만 선별하였다.

#### 3) Northern blot analysis

세포에서 분리한 RNA 10  $\mu$ g을 1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후, Hybond N+

나일론 막(Amersham Pharmacia Biotech사, USA)으로 모세관법을 이용하여 옮겼다. 막을 1400 J/cm<sup>2</sup>의 자외선 조사한 후, 유리관속에 넣고 hybridization용액을 첨가하였다. 42°C에서 하루밤동안 prehybridization 시켰다. 32P가 표지된 BMP7을 nick translation kit (Promega, USA)를 사용하여 제조한 후, 1x10<sup>6</sup> cpm/ml로 hybridization용액에 첨가하였다. 42°C에서 16~18시간 반응시킨 후, 2× SSC에서 5분간 상온에서 세척하였다. 2× SSC, 0.1% SDS 용액으로 42°C에서 30분간, 0.5× SSC, 0.1% SDS 용액으로 42°C, 30분간 세척하였다. -70°C에서 X-선 필름을 감광시킨 후, 현상하여 BMP7의 mRNA 발현을 확인하였다.

#### 4) Alkaline phosphatase 활성 염색

C2C12 세포를 24 well plate에 70% 정도 차지하도록 배양하였다. 배양액을 제거한 후, BMP7을 발현하는 것으로 확인된 HEK 293 세포의 배양액을 넣고 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 72시간동안 배양하였다. 세포를 PBS 용액으로 한번 세척한 후, 2% paraformaldehyde 용액으로 30분간 고정하였다. PBS로 두 번 세척하고 alkaline phosphatase 활성을 alkaline phosphatase 염색 시약 (Sigma사, USA)으로 확인하였다.

#### 5) HEK 293 세포를 포함한 collagen sponge 제작

흰쥐의 꼬리를 잘라서 70% ethanol로 소독한 다음 껍질을 벗기고 힘줄을 분리해내고 0.1% glacial acetic acid에 48시간 동안 교반하여 type I collagen 용액을 만들었다. collagen 용액 24 ml에 4 ml의 0.1 M NaOH를 혼합하여 1500 g-force에서 30분간 원침 후 상청액을 버리고 0.1% glacial acetic acid 15 ml을 넣어

침전물을 녹였다. 이렇게 만든 collagen 용액 12 ml에 2배 농축한 DMEM 용액 8 ml, FBS 2.4 ml을 혼합한 후 0.1 M NaOH로 pH를 조절한 다음 HEK 293 세포와 사람섬유모세포를 4:1로 혼합한 것을 최종농도가 1×10<sup>6</sup>/ml이 되도록 부유한 DMEM 용액 1 ml을 첨가하여 12 well plate에 well 당 1 ml 씩 분주하였다. 이때 대조군으로는 BMP-7 대신 Lac Z가 전달된 HEK 293 세포를 같은 조건으로 사용하였다. CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양 후 중합된 collagen sponge를 10%의 FBS가 첨가된 DMEM 용액으로 배양하였다.

#### 6) 누드마우스에 collagen sponge 이식

실험군(BMP-7) 및 대조군(Lac Z)의 collagen sponge를 10% FBS가 포함된 배양액으로 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 collagen sponge가 적절한 크기로 축소될 때까지 배양시킨 후에 누드마우스의 등쪽의 피하조직 두부위에 이식한 후 3, 6, 9주 째에 마우스 2마리씩을 희생시켜서 뼈형성 여부를 관찰하였다. 누드마우스에의 이식은 ether로 마취하여 피부를 포타딘과 제파논으로 소독한 후 안과용 가위로 이식할 부위의 피부를 절개하여 피부밑 조직층을 박리하고 collagen sponge가 들어갈 공간을 확보하였다. rhBMP-7 유전자가 형질도입된 HEK 293 세포를 포함한 collagen sponge를 누드마우스의 등에 이식하고 대조군으로는 Lac Z 유전자가 전달된 HEK 293 세포를 포함한 collagen sponge를 이식하였다. 수술용 봉합사로 봉합하고 사육하였다.

#### 7) 조직 검사

누드 마우스에 collagen sponge를 이식한 부위를 적출하여 3.7% paraformaldehyde로 2시간 고정후 25% sucrose에 넣어 하룻밤동안 두

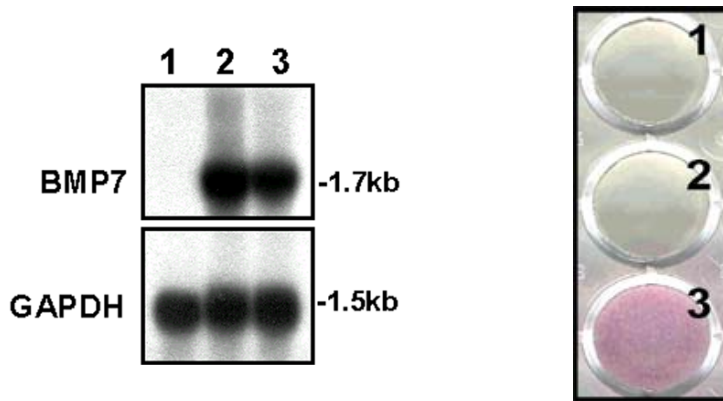


Fig. 1. Expression of BMP7 in HEK293 cells. (A) Northern blot analysis of BMP7 mRNA expression in the HEK293 cells. Lane 1, vector-transfected cells; Lane 2 and 3, pcDNA/BMP7-transfected cells. (B) Alkaline phosphatase activity staining in C2C12 myoblast cells treated with conditioned media prepared from HEK293 cells. 1, from parental HEK293 cells; 2, from vector transfected HEK293 cells; 3, from BMP7-stable HEK293 cells.

었다가 다음날 5  $\mu$ m 두께의 냉동절편을 제작하였다. 일반 조직검사를 위해서는 PBS로 세척한 다음 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. 뼈 형성을 확증하기 위한 Von Kossa 염색은 냉동절편을 BPS로 세척 후 silver nitrate 용액에 두고 50분간 빛에 노출시킨 다음 증류수로 충분히 세척하여 sodium thiosulphate 용액에 5분간 두었다. 조직절편을 다시 증류수로 세척하고 알코올로 탈수 시킨 다음 xylene 으로 투명화하여 봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 8) 투과전자 현미경관찰

누드마우스를 희생시키고 적출한 collagen sponge를 포함한 이식 피부를 2.5% glutaraldehyde로 5시간 전고정 하였다. 고정된 조직을 7%(w/v) sucrose(pH 7.2)에 10% EDTA-2 Na 용액을 첨가하여 실온에서 교반기로 교반하면서 탈석회하였다. 이때 용액은 격일로 교환하였다. 충

분한 탈석회가 이루어지면 0.25M sucrose로 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 처리 후 PBS로 세척한 다음 1% osmium tetroxide로 1.5시간 후고정 하였다. PBS로 세척 후 순차적 농도의 ethanol로 탈수를 거친 후 propylen oxide로 치환하였다. Epon 812로 침투 후 60 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 중합시켰다. 중합된 block을 diamond knife로 70 nm 두께의 초박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 20분 10분씩 이중 염색하여 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

#### 결 과

재조합 BMP7을 안정적으로 발현하는 HEK 293세포에서 BMP7 유전자 발현 여부를 Northern blot으로 분석한 결과 BMP7 재조합 유전자가 잘 발현됨을 확인하였다(Fig. 1A). BMP7 발현 HEK 293 세포에서 활성형 BMP7의 분비를

C2C12 세포를 이용한 alkaline phosphatase 활성염색으로 조사하였다. C2C12 세포는 생쥐 promyoblast로서 BMP의 처리에 의해 뼈세포로 분화되며, 그 과정에서 alkaline phosphatase 활성이 증가하는 것으로 잘 알려져 있다. 이 연구에서도 HEK293/BMP7세포 배양액을 C2C12 세포에 처리한 결과, alkaline phosphatase 활성이 증가됨을 확인하였다(Fig. 1B). 이렇게 해서 재조합된 BMP-7으로 형질도입된 HEK 293 세포와 섬유모세포를 혼합하여 만들어진 collagen sponge는 제작 직후에는 얇은 원반 형태를 형성하였으나 시간이 갈수록 점차 작은 크기로 수축되어 약간의 탄력성을 지닌 sponge 모양의 구조물을 형성하였다(Fig. 2). 적당한 크기만큼 줄어든 collagen sponge를 nude마우스의 등부위 피부를 박리하고 피하에 이식하였는데 (Fig. 3), 이식수술 직후에는 피하에 있는 collagen

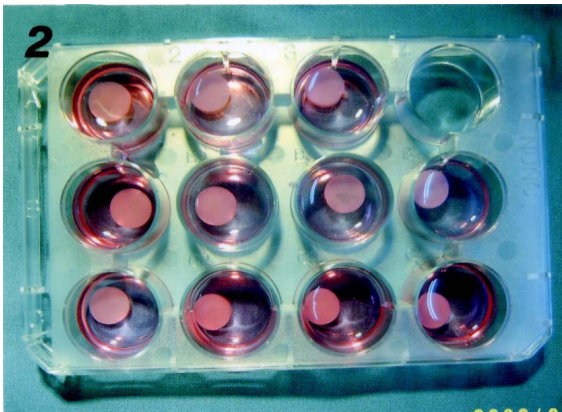


Fig. 2. Preparation of collagen sponge containing fibroblast and HEK 293 cells transfected with rhBMP-7 or Lac Z. Collagen gel was mixed with cells and incubated in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The collagen gel was retracted to form sponge and became opaque.

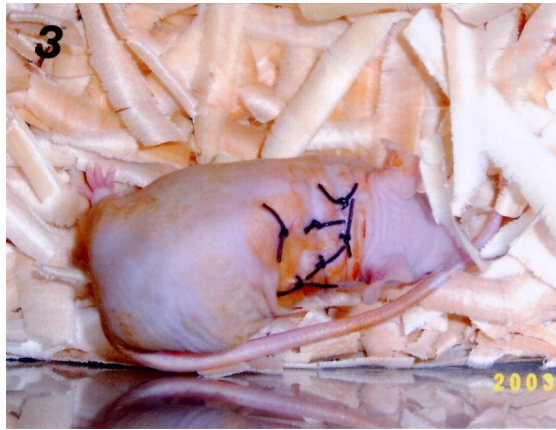


Fig. 3. Photograph of nude mouse, which was transplanted with collagen sponge.

sponge의 부피감을 육안으로 관찰할 수 있었으나 수술 후 2주 쯤부터는 시간이 갈수록 주변조직에 흡수되어 이식부위의 피부는 수술직후의 돌출감이 점차 사라졌다. 이식 수술 후 3, 6, 9주 쯤에 nude마우스를 희생시켜 조직학적 변화를 관찰하였다. 3, 6주 쯤에는 특별한 조직학적 변화를 관찰할 수 없었지만 collagen 성분이 시간이 갈수록 점차 주변조직에 흡수되어 처음 이식했을 때보다 그 크기가 많이 축소되어 가는 것을 알 수 있었다. Collagen sponge 이식 후 3주, 6주 쯤까지는 대조군과 BMP-7 실험군에서 모두 특별한 조직학적 변화를 보이지 않았다. 9주 쯤로 접어들면서 BMP-7이 전달된 실험군에서는 이식된 HEK 293 세포와 섬유모세포들이 숙주조직과 접한 부위의 세포들 사이사이에 침투되어 들어가면서 이식 부위와의 경계가 불분명해져 있었고 다수의 뼈세포들이 증식하여 이식부위를 중심으로 산재해 있었으며 산발적으로 뼈소편의 형성이 관찰되었다. 그러나, Lac Z가 전달된 대조군에서는 HEK 293 세포와 섬유모세포의 조직학적 소견

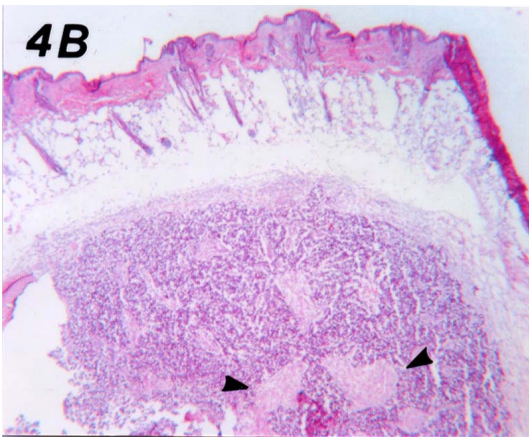
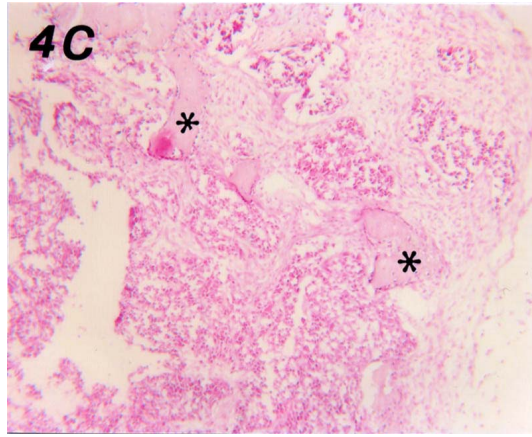
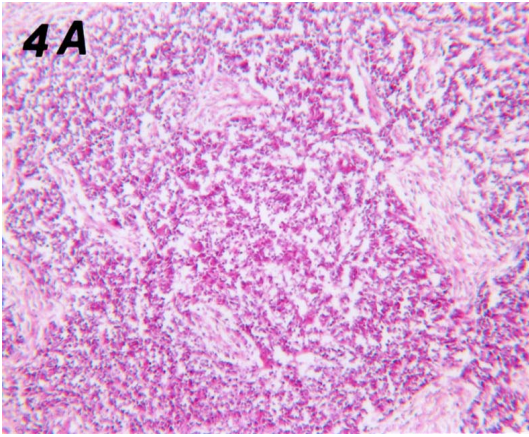


Fig. 4. Light micrograph of the transplants of vector only (A) or rhBMP-7 (B, C) transduced HEK 293/fibroblast within collagen sponge at 9 weeks after transplantation.

(A) HEK 293 cells and fibroblasts were observed in the transplant, but bony spicules were not formed ( $\times 200$ ). (B) Newly formed bone spicules were observed in the collagen sponge ( $\times 40$ ). (C) A lot of osteoblasts appeared around bony spicules (\*) and aggregated HEK 293 cells are visible ( $\times 200$ ).

은 실험군과 유사하였으나 collagen의 흡수는 미흡한 편이었으며 뼈모세포와 뼈소편의 출현은 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 4A, 4B, 4C). 뼈조직의 형성은 Von Kossa 염색에서 뚜렷한 양성반응으로 확인할 수 있었다(Fig. 5). 그러나, 이처럼 새로이 출현한 세포들에 대한 숙주조직의 혈관 신생은 그다지 활발하지 않았다. 실험군에서 관찰된 뼈형성 부위를 투과전자 현미경으로 관찰하였는데 뼈모세포로 보이는 세포들을 관찰할 수 있었다. 이들은 핵이 한쪽으로 편재되어 있으며 세포질내에 잘 발달된 과립형질내세망을 가지고 있었다(Fig. 6).

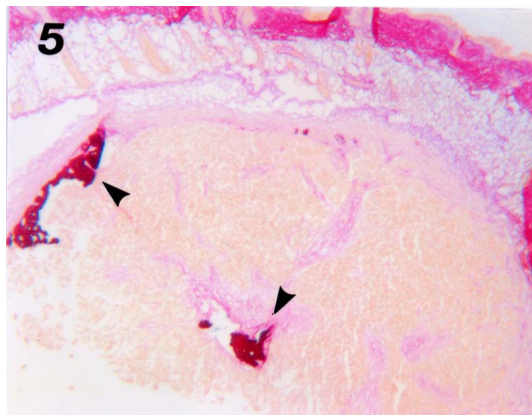


Fig. 5. Bony tissue showed positive reaction for Von Kossa stain in the rhBMP-7 transduced transplant ( $\times 40$ ).

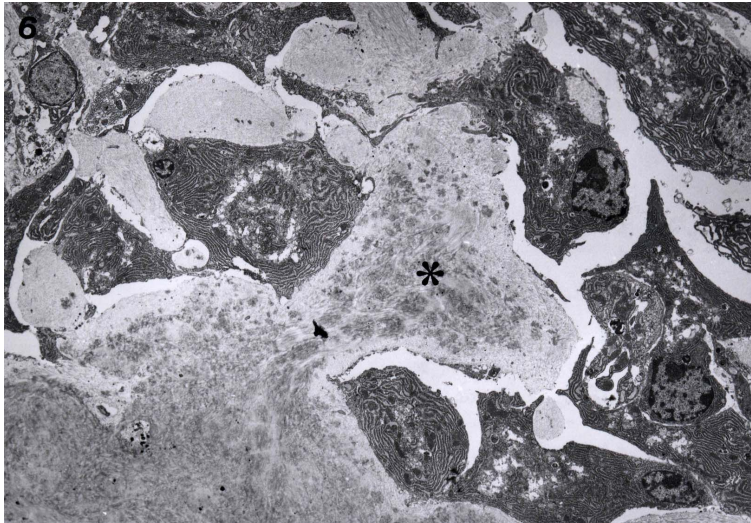


Fig. 6. Electron micrograph of collagen sponge at 9 weeks after transplantation. The cells, evaluated to osteoblasts which have well developed rER and eccentrically located nucleus, were arranged around bony matrix(\*)( $\times 1,000$ ).

#### 고 찰

골격은 우리 몸에서 외부형태와 물리적인 기능을 유지할 수 있도록 하는 가장 기본적인 구조물이다. 따라서, 뼈의 손상 혹은 손실이 있을 때에는 빠른 시간 내에 뼈의 본래의 크기와 형태로 복구하도록 하는 것은 매우 중요하다. 뼈형성에는 다양한 종류의 분자물질들과 호르몬, cytokine, 그리고 성장인자들이 직, 간접적 자극이나 억제작용에 의하여 복잡한 상호작용을 거쳐 영향을 미치는데, 지금까지 밝혀진 이러한 다양한 인자들에 의한 작용기전을 토대로 뼈세포의 생성 및 분화를 촉진하는 최적의 조건을 알아내고자 많은 연구들이 이어져 왔다. 현재까지는 뼈형성을 유도하는 BMP에 의한 유전자 치료가 주목을 받고 있고 또한 다양한 방법들이 개발되고 있다.

이 연구에서는 BMPs 중에서 골질의 초기에 주로 발현되는 BMP-2, 4 보다는 뼈형성 기간 전반에 걸쳐 발현되며 뼈형성 유도 능력 또한 높은 것으로 알려진 BMP-7으로 형질도입한 세포들을 누드 마우스에 이식하는 ex vivo gene therapy를 시도하였는데, 이때 사용된 세포는 분열속도가 빨라 BMP-7 유전자를 전달 후 세포 선별작업에 시간을 단축할 수 있는 HEK 293 세포주를 사용하였다. 하지만 HEK 293 세포는 collagen 용액과 배양하더라도 sponge 수축 능력이 미미하여 어느 정도의 강도를 가진 조직을 형성하기 힘들다. 이를 보완하기 위해서 sponge 수축능력이 뛰어난 섬유모세포를 첨가하였다. 섬유모세포만으로 collagen sponge를 제작할 경우 약 하루정도 배양시 collagen의 수축을 육안으로 확인할 수 있으나 HEK 293 세포를 혼합한 것에서는 평균 2~3일정도



더 연장되어 나타났다. 이러한 현상의 원인을 분석해 볼 때 sponge 제작과정에서 제공되는 공여세포의 수에 따라 수축기간을 단축시키는 원인 이외에도 HEK 293 세포가 sponge를 수축시키는 힘이 섬유모세포에는 미치지 못하는 것으로 추정할 수 있다. 한편으로는 최소한 HEK 293 세포가 collagen sponge의 수축을 방해하지는 않으므로 세포분열이 왕성한 HEK 293 세포와 collagen의 응집력이 뛰어난 섬유모세포를 혼합한다면 전체적인 collagen sponge의 제작기간을 줄이는데 충분히 기여할 것으로 생각된다.

9주 짜의 조직학적 소견을 보면 collagen sponge를 이식한 부위가 마치 결절을 형성하고 있는 듯 한데 이를 구성하고 있는 세포들을 살펴보면 운반체와 함께 이식된 HEK 293 세포와 섬유모세포 그리고 뼈모세포들로 구성되어 있다(Fig. 4). 뼈모세포들이 많이 모여 있는 부위의 중심부에는 뼈소편이 형성되어 뼈조직의 근간을 이루기 시작하고 있는데 이런 부분들이 Von Kossa 염색에서 확실한 양성반응을 보였다(Fig. 5). 투과전자 현미경으로 관찰한 결과에서도 다수의 뼈모세포의 특징을 갖춘 세포들과 주변에는 뼈기질들이 형성되어 있는 것으로 보아 뼈의 형성이 이루어진 것으로 보인다. 하지만 이러한 예상되어진 세포들의 출현 이외에도 명확히 단정지을 수 없는 세포집단들이 뼈소편과 뼈모세포들 사이사이에서 발견되었는데 아마 이식을 받은 생체조직에 있던 미분화 세포들이 BMP-7의 자극을 받아 뼈모세포로의 분화과정에 있는 세포인 것으로 추정된다. 이미 형성된 뼈모세포들이 이식된 HEK 293 혹은 섬유모세포에서 기원한 것인지 아니면 이식 받은 생체의 피하조직에 존재하던 미분화 세포

들이 분화된 것인지 정확히 그 기원을 알 수는 없다. 그 기원을 정확히 알기 위해서는 부수적인 다른 조사가 뒤따라야 하겠지만 어느 정도 분화가 진행된 세포는 BMP의 영향하에서도 뼈형성 전구세포로 분화될 가능성은 높지 않은 것으로 알려져 있다(2). 그래서 현재로서는 HEK 293 세포에서 분비하는 BMP 7이 피하조직에서 화학주성으로 주위에 미분화세포를 불러오고 이들을 뼈모세포로 분화를 유도했을 것으로 추측된다. 이에 앞서 결론 지을 수 있는 사실은 HEK 293 세포를 공여세포로 하여 분비된 BMP-7이 뼈조직이 아닌 다른조직에서 뼈형성의 유도가 이루어진다는 것이다. 또한 BMP-7 유전자가 전달된 세포를 이용하여 뼈형성 유도를 위한 유전자치료를 시도할 때 섬유모세포와 collagen 용액을 이용해 만드는 collagen sponge를 이용하는 조직공학적 방법은 효율적인 접근법이라고 판단된다. 아울러 유전자치료의 실제 임상적 응용을 위해서는 자가세포의 이식이 필요하므로 BMP-7 유전자치료법의 효과적인 적용을 위해서는 플라스미드 이외에도 바이러스 벡터를 이용하는 방법 등 여러 가능성 있는 방법을 동원하여 수확과 증식이 손쉽고 BMP-7 분비가 우수한 세포를 활용할 수 있는 방법이 연구되어야 하리라 생각된다.

## 결 론

뼈손상의 복구를 위한 유전자 치료 연구에 있어 보다 적합한 유전자의 선택과 뼈형성 환경을 유도하기 위한 이전의 연구들에 기초하여 rhBMP-7으로 형질도입된 HEK 293 세포와 섬유모세포의 혼합 세포로 제작한 collagen sponge를 누드 마우스의 피하에 이식하여 9주 짜에

뼈형성의 유도를 확인하였다. 세포 증식률이 우수한 HEK 293 세포주를 공여세포로 사용하여 뼈형성의 가능성을 확립하였으므로 이 결과는 유전자 치료의 임상적용에 앞서 선구적인 실험을 하는데 필요로 하는 collagen sponge의 제작기간을 단축시키고 보다 효율적으로 응용할 수 있는 근거가 마련되었다고 할 수 있다.

#### 참 고 문 헌

1. Salamon ML, Althausen PL, Gupta MC, Laubach J: The effects of BMP-7 in a rat posterolateral intertransverse process fusion model. *J Spinal Disord Tech* 16(1): 90-95, 2003.
2. Urist MR: Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res* 12: 343-346, 1997.
3. Hollinger JO, Uludag H, Winn SR: Sustained release emphasizing recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Adv Drug Deliv Rev* 31(3): 303-318, 1998.
4. Groeneveld EH, Burger EH: Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 142(1): 9-21, 2000.
5. Alden TD, Varady P, Kallmes DF, Jane JA Jr, Helm GA: Bone morphogenetic protein gene therapy. *Spine* 27: s87-s93, 2002.
6. Krebsbach PH, Gu K, Franceschi RT, Rutherford RB: Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts from bone in vivo. *Hum Gene Ther* 11(8): 1201-1210, 2000.
7. Bosukonda D, Shih MS, Sampath KT, Vukicevic S: Characterization of receptors for osteogenic protein-1/bone morphogenetic protein-7 (OP-1/BMP-7) in rat kidneys. *Kidney Int* 58(5): 1902-1911, 2000.
8. Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenvald JA, Smith LP, Longaker MT: Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg* 107(1): 124-134, 2001.
9. Chen Y, Cheung KM, Kung HF, Leong JC, Lu WW, Luk KD: In vivo new bone formation by direct transfer of adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 298(1): 121-127, 2002.
10. Rutherford RB, Moalli M, Franceschi RT, Wang D, Gu K, Krebsbach PH: Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue Eng* 8(3): 441-452, 2002.
11. Chelina AJ, Reddi AH, Martin RB: Bone morphogenetic protein-7 selectively enhances mechanically induced bone formation. *Bone* 31(5): 570-574, 2002.
12. Yamanouchi K, Satomura K, Gotoh Y, Kitaoka E, Tobiume S, Kume K, Nagayama M: Bone formation by transplanted human osteoblasts cultured within collagen sponge with dexamethasone in vitro. *J Bone Miner Res* 16(5): 857-867, 2001.