

의학 연구 논문

인간 지방유래 줄기세포의 분화능과 주변 분비
효과의 분석 및 황산 콘드로이틴 기반
휘트로카이트 골충전재와 효용가능성 확인

Analysis of Differentiation Potential and Paracrine
Effect of Human Adipose Tissue Derived Stem
Cell(hADSC) and Confirmation of Synergistic
Potential with Chondroitin Sulphate-based
Whitlockite Demineralized Bone Matrix

2018 년 12 월

서울대학교 의과대학

의학과 하주민

지도교수 허찬영

초록(Abstract)

Stem cell is undifferentiated cells that can differentiate into diverse types of body tissues. As the undifferentiated stem cells can differentiate into various human tissues with proper conditions, there are ongoing efforts to regenerate damaged tissues that have been injured by diseases or traumas into normal status. Our research aimed to isolate and culture multipotent human adipose derived stem cells(hADSC) from adult adipose matrix cell. hADSC is relatively free from ethical issues than embryonic stem cells and more easily accessible and have less pain to donors than bone marrow which is traditionally used to isolate adult mesenchymal stem cells.

First of all, we characterized hADSC by confirming mesenchymal surface markers with flowcytometry. After then, we induced differentiation of hADSCs into chondrocyte and osteocyte whose self-regeneration is limited when injured and confirmed the capacity to differentiate into mesenchymal lineages of hADSCs with Safranin Red and Alizarin Red Staining. Besides, we cocultured preadipocyte cell lines with isolated hADSCs. We identified the paracrine signaling capability of hADSCs through Oil Red O staining. Afterwards, we quantified the degree of adipogenic differentiation of those cells and characterized stemness gene expression and adipocyte characteristic marker via RT-PCR.

Besides, with help of recently emerging bioengineering technique we synthesized chondroitin sulphate-based whitlockite demineralized bone matrix(DBM) which seems to boost osteogenesis when injected as scaffolds in bone defects. We cocultured hADSCs on the DBM and confirmed their cell viability through Live & Dead staining.

This article shows the multipotent potential of hADSCs through various mesenchymal cell lineages and their possible utilities. Not only hADSCs can be treated by differentiation and proliferation by themselves, but also the secretomes they produce can promote adipogenesis through paracrine signaling and their possible uses in clinics would be limitless. Furthermore, the possibility of stem cell therapy in combination with bioengineering in incurable bone diseases can be opened up by examining and applying the conclusion that we suggest via various follow up studies.

Table of Contents

I. INTRODUCTION

I-1. Basic Concepts of Stem Cell Science --- 8

I-2. Current Research on Stem Cell Therapy --- 10

I-3. Chondroitin Sulphate Based Whitlockite Demineralization Bone Matrix --- 12

II. MATERIALS AND METHODS

II-1. Isolation and Culture of human Adipose Derived Stem Cells(hADSC) --- 14

II-2. Flowcytometry(MSC surface markers) --- 19

II-3. Differentiation of hADSC into Osteocytes and Alizarin Staining --- 21

II-4. Differentiation of hADSC into Chondrocytes and Safranin O Staining --- 24

II-5. Coculture of hADSC on Preadipocyte cell lines and Oil Red O Staining --- 27

II-6. Real Time PCR(Stemness genes & adipocyte characteristic markers) --- 32

II-7. Synthesis of Chondroitin Sulphate-based Whitlockite Demineralized Bone Matrix(DBM) --- 38

II-8. Quantative Analysis of DBM: X-Ray Diffraction(XRD) --- 40

II-9. Coculture of DBM on hADSC with Osteogenic Differentiation Media --- 41

II-10. Live & Dead Staining --- 42

III. RESULTS

III-1. Isolation and Culture of human Adipose Derived Stem Cells(hADSC) --- 44

III-2. Characterization of Adipose Derived Stem Cells: Flowcytometry --- 46

III-3. Chondrogenic & Osteogenic Differentiation of hADSCs --- 48

III-4. Adipogenic Differentiation of hADSC by paracrine signaling --- 53

III-5. Cell viability of hADSC on Chondroitin Sulphate-based Whitlockite
Demineralized Bone Matrix: Live & Dead Staining --- 65

IV. DISCUSSION --- 68

V. REFERENCES --- 72

Lists of Tables

<Table 1> The general doses of antibody for FACS assay

<Table 2> 2%(80mM) Alizarin Red S Composition

<Table 3> 0.1% Safranin O Red Staining

<Table 4> Composition of control growth media and Adipogenic differentiation media

<Table 5> 1% Oil Red O Solution Compositions

<Table 6> Primer sequence designed for real-time PCR. The sequence is written from 5' to 3'

<Table 7> RNA concentration and purity of preadipocytes classified by culture types and samples

<Table 8> Real-time PCR cycling conditions. The condition is optimized referring to the protocol used in the laboratory.

<Table 9> Live & Dead Dilution Composition

Lists of Figures

<Figure1> Coculture of hADSC on preadipocyte cell lines. There are four experimental groups divided by presence of hADSC on coculture transwell and media compositions

<Figure 2> Morphologic changes of isolated hADSCs(P1 to P5) through its passages.

Isolated in 2018.11.01

<Figure 3> Confirmation of MSC surface markers of hADSCs(P5): CD19, CD34, CD45, CD90, CD105, HLA-DR.

<Figure 4> Morphologic changes of hADSCs(P6 to P7) through its passages. It was isolated 2018.10.10

<Figure 5> Confirmation of osteogenesis and chondrogenesis of hADSCs(P7) cultured in their own differentiation media. The following are optical photographs of control group(growth media), experimental group(differentiation media), Alizarin Red staining and Safranin O staining

<Figure 6> Adipogenesis of preadipocytes. There are four experimental groups. They are cultured in 12 well plate and 6 well plate, all of whose transwell are set up. Experimental

group 1: control media on empty transwell with differentiation media on the plate.

Experimental group 2: control media on hADSCs with differentiation media on the plate.

Experimental group 3: differentiation media on empty transwell with differentiation media on the plate. Experimental group 4: differentiation media on hADSCs with differentiation media on the plate.

<Figure 7> Analysis of stemness gene(hSOX2) and adipogenic differentiation marker (hADIPOQ, hCEBPA, hFABP4, hPPAR γ).

<Figure 8> Quantative and phase analysis of Whitlockite.

<Figure 9> Live & Dead staining of hADSCs. In the control group hADSCs were only cultured in osteogenic differentiation media, however the in the hydrogel group hADSCs were cultured in osteogenic differentiation media with hydrogel cocultured

I. Introduction

I-1. Basic Concepts of Stem Cell Science

질병과 외상으로 손상된 골결손부와 연골결손부의 자가재생능력은 제한적이며 일단 발생한 손상으로부터 정상 상태로 되돌리는 것은 거의 불가능하다고 알려져 있다. 결손부를 이전의 상태로 되돌리기 위해 많은 시도가 이루어졌으며 이러한 방법의 가장 이상적인 목표로 줄기세포를 이용한 자가조직의 재생이 주목받게 되었다.

줄기세포란 아직 분화하지 않은 세포로 여러 종류의 신체조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포를 말한다. 미분화 상태에서 적절한 조건을 갖추어 주면 줄기세포는 인체의 다양한 신체조직으로 분화할 수 있어 손상된 조직을 재생하기 위한 치료로 쓰기 위한 노력이 진행되고 있다.

줄기세포는 자가재생능력(Self-Renewal Capacity), 장기간 생존능(Long Term Viability), 다분화능(Multilineage Potential)이란 세 가지 특성을 가지고 있으며 여기서 분화능이란 한 종류의 줄기세포로 여러 계통의 세포나 조직으로 발달할 수 있는 능력을 말한다. 줄기세포의 분화능은 분화할 수 있는 계통의 종류에 따라

전능성(totipotency), 만능성(pluripotency), 다분화성(multipotency), 이분화성(bipotency), 단일분화성(unipotency)가 있으며 발생 초기의 세포일수록 분화능이 높다. 다시 말해 성체 조직에서 유래한 성체줄기세포와 달리 발생 초기에 생성되는 배아줄기세포의 분화능이 더 높다고 할 수 있다. 그러나 배아줄기세포는 실험적으로 세포를 배양하기 쉽지 않고 윤리적인 문제 때문에 실질적인 임상 사용에는 제한이 있다. 그와 달리 성체줄기세포는 체내에 존재하고 있다가 필요한 때에 특정한 조직의 세포로 분화할 수 있는 미분화 세포를 말한다. 성체줄기세포는 배아줄기세포에 비하여 세포 수가 적고 증식이 어렵다는 단점이 있지만 획득이 용이하고, 이미 성장한 조직에서 추출하기 때문에 윤리적 논쟁에서 자유롭다. 따라서 현실성 있는 방안으로 쉽게 채취 가능하고 윤리적으로도 수용 가능한 지방유래 줄기세포나 피부 유래 전구 세포들이 임상에서 자가이식의 대안으로 떠오르게 되었다.

본 연구는 성체 지방 조직에서 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)의 일종인 인간 지방유래 줄기세포를 분리, 배양하려고 시도하였다. 이를 Flowcytometry 를 통해서 중간엽 줄기세포의 특성을 확인하고, 연골 세포와 골세포 등 중배엽 기원의 인체 조직으로 분화를 유도하여 줄기세포로서의 다분화능을 확인하고자 한다.

I-2. Current Research on Stem Cell Therapy

최근에는 중간엽 줄기세포의 증식과 분화능에 대한 연구가 이루어져 다른 공급원의 성체줄기세포보다 줄기세포의 특성이나 분화능이 뒤떨어지지 않음이 보고되고 있다. 뿐만 아니라 과거에는 배아줄기세포의 특성으로 알려져 있던 다른 배엽으로의 분화, 즉 이행분화(transdifferentiation)도 가능하다고 밝혀졌고 중간엽 줄기세포를 손상 받은 장기에 직접 주입하지 않고 혈관이나 주변 조직에 이식하더라도 손상 장기로 동원되어 손상 부위를 복구한다는 연구들도 보고되고 있다.

인간 지방유래 줄기세포는 앞서 언급한 듯이 줄기세포의 증식과 분화능을 활용하 자기이식의 방안으로도 주목받지만, 최근에는 줄기세포 스스로의 능력이 아닌 분비하는 물질에 의해 손상된 조직을 재생시키려는 시도가 이어지고 있다. 인간 지방조직은 성장인자, 싸이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 신경단백질(neuropeptide), 시상하부 호르몬과 자극 호르몬 등이 포함된 아디포카인(adipokine)을 분비하며, 인간 지방유래 줄기세포는 T 림프구, 항염증성

대식세포, 내피전구세포, 지방전구세포를 포함하는 분비체들을 통해서 외상이나 질병으로 손상된 조직을 재생시킬 수 있는 가소성을 지니고 있다.

이에 따라 이제 인간 지방유래 줄기세포 자체의 증식과 분화에 의한 치료 효과에서 벗어나 줄기세포가 분비하는 물질에 의해 치료 효과를 내리는 과정에 주목하게 되었다. 이 특성을 줄기세포의 주변 분비 효과(paracrine signaling effect)라고 하며 줄기 세포와 세포 사이에 분비체들로 신호가 매개되어 세포의 생존능을 높이고 성장을 촉진시키며 사멸을 억제하는 인자는 증가시키고, 반대로 세포의 생존능을 감소시키며 사멸을 일으키는 인자는 소비하려는 성향을 밝혀내고자 하였다. 본 연구는 인간 지방유래 줄기세포를 지방 전구세포와 공배양하여 줄기세포가 내는 분비체들이 주변 분비 효과에 의해서 지방 분화를 유도할 수 있는지 확인하고 이를 흡광도와 RT-PCR 을 통해 정량적으로 분석하고자 한다.

I-3. Chondroitin Sulphate Based Whitlockite Demineralization Bone Matrix

외상과 질병으로 손상된 골 결손부를 치유하기 위한 방안으로 자신의 신체 타 조직에서 골을 채취해 이식하는 자가골이식술(*autologous bone graft*), 동종이나 이종에서 채취된 골을 이식거부반응이 없도록 처리하여 이식하는 이종골이식술(*heterogous bone graft*) 및 인조골이식술(*artificial bone graft*) 등이 기존에는 있었으나, 이러한 방법들은 결손부를 채우기 위한 공여 골의 부족, 생착률의 저하, 이식된 골의 흡수 경향 등의 문제점을 안고 있었다. 이런 문제점에 맞서 앞서 언급한 자가 줄기세포를 배양하여 결손부에 생착하려는 노력들이 시도되었으나 아직까지 그 성과는 미미하였다.

이에 따라 줄기세포의 분화 능력을 골이식재와 연동하여 그 효과를 증가시키려는 시도를 해보고자 하였다. 콘드로이틴(*Chondroitin Sulphate*)는 결합조직 내에서 글리코스아미노글라이칸(*Glycosaminoglycan*)의 주성분인데 칼슘 이온(Ca^{+2})과 마그네슘 이온(Mg^{+2}) 등 양이온을 끌어당겨 골형성에 있어 호의적인 환경을 만드는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 칼슘 이온(Ca^{+2})과 마그네슘 이온(Mg^{+2}) 등의

양이온과 결합했을 때 신호 전달 경로에도 관여하여 골 재생을 증가시키고 세포 외 기질의 침착과 생체미네랄화(biomineralization)을 촉진시킨다고 알려져있다.

본 연구는 황산 콘드로이틴의 파트너로서 결합할 수 있는 물질로 칼슘 이온(Ca^{+2})과 마그네슘 이온(Mg^{+2}), 인(P)으로 조합된 휘트로카이트(Whitlockite)에 주목하였다. 대용량 휘트로카이트를 제조해본 뒤 이를 X-선 회절을 이용해 정량과 상을 분석하고 황산콘드로이틴과 반응시켜 하이드로겔(hydrogel) 골충전재를 만들어보고자 하였다. 그리고 인간 지방유래 줄기세포와 공배양하여 골분화에 있어 둘의 생체적합성을 알아보려고 하였다.

II. Materials and Methods

II-1. Isolation and Culture of human Adipose Dervied Stem Cells

아래의 인간 지방유래 줄기세포의 분리(Isolation) 과정은 모두 클린 벤치 안에서 수행되었다. [2018.11.01 진행] 수술실에서 인체 유래물 연구 동의서를 받은 절제 조직(excision sample)을 받아 PBS with 1% P/S 가 들어간 100mm plate 에 절제 조직을 담고 매스를 이용하여 힘줄, 섬유조직, 수술 과정 중 열에 탄 흔적들을 깨끗이 제거하였다. 이때 위의 불순물들을 육안 상으로 보이지 않도록 최대한 분리하였다. 50ml conical tube 에 지방조직을 25ml 씩 담아 PBS with 1% P/S 을 10~15ml 으로 지방조직에서 핏기가 사라질 때까지 3~4 번 반복하여 씻어냈다. 그리고 미리 collagenase powder 를 제공받은 절제 조직의 양에 맞춰 정량하여 0.1% collagenase solution(in PBS with 1% P/S)을 만들어 50ml conical tube 에 씻어낸 지방조직과 1:1 의 비율로 혼합하였다. 이때 옮겨 담은 절제 조직이 collagenase 에 적절히 반응할 수 있도록 죽상이 될 때까지 가위로 반복하여 잘랐다. 그 다음 37°C water bath 에서 1 시간동안 incubation 하였다. 이때 10 분에 한번씩 inverting 하여 조직과 0.1% collagenase 가 잘 반응할 수 있도록 한다. 시간이 경과되었으면 conical tube 를

흔들어보아 섬유조직과 불순물이 충분히 제거된 것을 확인하고 1300rpm, 25°C 에서 3 분동안 원심분리하였다. 그러면 지방조직이 4 개의 층으로 나뉘는데 위부터 순서대로 기름층(oil layer), 지방조직층(adipose tissue layer), 하층액(infranatant), 기질세포분획(stromal vascular fraction, SVF)라고 부른다. 여기서 기름층과 지방층의 1/3에서 1/2을 pip-aid 를 이용하여 제거하고 나머지를 pip-aid 로 기질세포분획이 섞이도록하여 새로운 50ml tube 에 옮겼다. 이후 media 라고 지칭할 Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM) solution(10% FBS, 1% P/S)와 1:1 의 비율로 잘 혼합한 다음 1300rpm, 25°C 에서 3 분간 원심분리하였다. 마찬가지로 여기서 기름층과 지방층의 1/3에서 1/2을 pip-aid 를 이용하여 제거하고 나머지를 pip-aid 로 기질세포분획이 섞이도록하여 새로운 50ml tube 에 옮겼다. 이때 100um strainer 로 미세하게 남아있는 섬유조직을 마저 걸러주어 20~25ml 정도 걸러진 지방 조직을 얻어내었다. 그러면 동량의 media 를 혼합하여 다시 1300rpm, 25°C 에서 3 분간 원심분리한 다음 SVF pellet 만 남기고 상층액을 모두 suction 하여 제거하였다. 확보한 pellet 에 동량의 media 를 넣어 resuspension 한 뒤 100mm plate 에 분주하여 현미경으로 관찰하였다.

배양(Culture)는 크게 배양액 교체(Media change)와 계대배양(Subculture)으로 진행하였다. 먼저 배양액 교체는 계대배양을 마친 2 일 후, 그리고 정기적으로 3 일에 1 번씩 수행하였다. Suction tip 에 200p 짜리 micropipette tip 을 낀 다음 기존에 들어간 media 를 제거하고 pip-aid 를 이용하여 새로운 media 를 100mm plate 의 경우 10ml 를 5ml 씩 두 번, 150mm plate 의 경우 24ml 씩 12ml 씩 두 번에 걸쳐 주입하였다. 이때 분주되는 media 가 plate 에 부착한 세포를 떨어트리지 않도록 pip-aid 를 벽면에 닿도록 하였다.

계대배양은 기존 plate 에 세포가 꽉 차게 자라면 겹겹이 자라지 않도록 세포를 여러 plate 에 분할하여 배양을 이어나가는 것이다. 기존 plate 에서 세포를 떼어내기 위해선 trypsin-EDTA 0.1% solution 을 가해야 하는데 media 의 FBS 성분이 trypsin-EDTA 0.1% solution 의 작용을 억제하여 먼저 각 plate 에서 media 를 suction 한다. 다음 pip-aid 에 PBS with 1% P/S 를 100mm plate 의 경우 5ml, 150mm plate 의 경우 10ml 씩 담아 plate 의 벽면에 따라 주입한 뒤 살살 흔들어 섞어주었다. 그리고 PBS with 1% P/S 를 suction 한 뒤 trypsin-EDTA 0.1% solution 을 100mm plate 의 경우 1.5ml, 150mm plate 의 경우 3ml 씩 가한 뒤 37°C 5% CO₂ 조건에서 3 분에서 5 분간 incubation 하였다. Incubation

후 적정 온도 아래에서 trypsin-EDTA 가 누리끼리해진 것을 확인하면 plate 의 측면을 손으로 가볍게 치면서 plate 에 부착되었던 세포가 떨어져 떠다니는 것을 현미경으로 관찰하였다. 다음으로 100mm plate 는 4ml 씩, 150mm plate 는 6ml 씩 media 를 가하여 trypsin-EDTA 의 작용을 중화하고 해당 용액을 15ml 또는 50ml conical tube 에 옮겨 담았다. 이때 plate 에 media 를 골고루 섞어 trypsin-EDTA 로 떨어진 세포를 가능하면 모두 수확할 수 있도록 담았다. 이제 모든 tube 를 1300rpm, 25°C 에서 3 분간 원심분리하고 상층액을 suction 한 뒤 pellet 을 남겨 media 를 100mm plate 의 경우 분주할 dish 당 1ml 씩, 150mm plate 의 경우 분주할 dish 당 2ml 씩 media 를 가하여 resuspension 하였다. 만들어진 용액을 10ul 와 Triphan-Blue 시약 10ul 씩 취하여 희석하였다. Triphan-Blue 시약은 살아있지 않은 것은 염색이 안 되어 바탕은 푸른 빛을 띄었고, 살아있는 세포는 빛을 반사하여 반짝거리 이를 hemocytometer 를 이용하여 세포 농도를 측정하였다. 마지막으로 각 plate 당 세포의 수가 3×10^5 (100mm plate) 또는 4.5×10^5 (150mm plate)가 되도록 resuspension 한 용액을 뿌리고 최종 volume 이 10ml(100mm plate) 또는 24ml(150mm plate)가 되도록 media 를 추가적으로 가하였다.

저장(Freezing)은 세포가 충분히 자랐을 때 이를 영구적으로 보관하기 위한 방법이다. 일반적으로 100mm plate 하나 당 cryotube 1 개, 150mm plate 하나 당 cryotube 2 개를 만든다. 먼저 계대배양과 동일하게 trypsin-EDTA 를 이용하여 세포를 수확한 다음 cryotube 하나 당 FBS 900ul, DMSO 10ul 을 가하고 몇 차례 pipetting 후 cryotube 에 담아 -80°C deep freezer 에서 overnight 로 보관하였다. 24 시간이 지나면 cryotube 를 deep freezer 에서 꺼내 액체 질소 탱크에 옮겨 담았다.

II-2. Flowcytometry(MSC surface Markers)

유세포분석(Flowcytometry)를 통해 분리배양한 hADSC가 중간엽 줄기세포로의 특성을 반영하는 표면 항원을 발현하는 지 알아보고자 하였다. 먼저 표면항원 6 종류, control 3 종류, unstain 1 종류로 총 10 개의 FACS sample 을 준비하였다. 분석을 위한 최종 조건은 표면 항원 하나 당 10^5 cells 이상의 세포라고 하나, 분석의 정확성을 위하여 5×10^5 cells 를 기본으로 세포를 배양하였다.

유세포 분석을 위한 전처리 과정으로 먼저 plate 에 있는 media 를 suction 하였다. 이후 계대배양과 마찬가지로 trypsin-EDTA 를 이용하여 줄기 세포를 추출한 다음 pellet 만 남겨 cold 한 상태의 PBS 6ml 로 pipetting 을 몇 번하여 resuspension 하였다. Hemocytometer 로 표면 항원 하나 당 필요한 세포 수를 측정하였다. Filter 뚜껑이 있는 FACS tube 마다 PBS 500ul 씩 분주 후 뚜껑을 열어 FACS 항체를 4~6ul 씩 넣고 tapping 하였다. 이 때 반드시 labeling 을 하고 control 별로 해당하는 sample 을 정렬해두었다. 다음으로 sample 을 호일로 감싼 뒤 ice 에서 1 시간 이상 incubation 하였다. Sample 을 얼음에 박은 상태로 FACS 기기로 이동해 촬영을 진행하였다.

<Table 1> The doses of antibody for FACS assay. Following antibodies are characteristic in the mesenchymal stem cells and express either positive or negative results. The injecting condition is optimized referring to the protocol used in the laboratory.

Type	Antibody	Injected Dose
Unstained	-	-
Positive	CD 44	5ul
	CD 90	4ul
	CD 105	5ul
Negative	CD 19	4ul
	CD 34	4ul
	HLA-DR	4ul
Control	IgG1	4ul
	IgG2A	4ul
	IgG2B	4ul

II-3. Differentiation of hADSC into Osteocytes and Alizarin Red Staining

p5 hADSC 샘플을 꺼내 [2018.11.16]에 p6 hADSC 로 계대배양하였고, [2018.11.18]에 배양액 교체를 해준 후 [2018.11.19]에 p7 hADSC 로 계대배양하였다. 이후 [2018.11.21]에 줄기세포를 계대배양과 동일한 과정으로 trypsin-EDTA 를 이용하여 줄기세포를 harvest 한 후 2000rpm, 10 분간 원심분리하여 1×10^5 cells 씩 각 well 당 분주하여 12well plate 2 개에 plate 하나 당 4well 씩, 총 8well 에 hADSC 를 배양하였다.

Media 를 넣어주고 세포가 12 well plate 에 안정하게 부착되었을 4 일째 되는 날인 [2018.11.24]에 12 well plate 에 각각 아래에 골분화 배지를 넣어주었다.

골분화 배양액 교체는 매 4 일마다 진행하여 [2018.11.28], [2018.12.02], [2018.12.06], [2018.12.10]에 교체해주었고 [2018.12.12]에 12 well plate 하나로 3 주차 현미경 사진을 관찰하였고, 남은 12 well plate 하나는 [2018.12.14]에 배양액을 교체하여 [2018.12.19]에 골분화 4 주차 현미경 사진을 관찰하였다.

3 주차와 4 주차의 현미경 사진은 아래의 과정인 Alizarin Red Staining 을 통하여
염색하였다.

[2018.12.12 진행] 먼저 골분화 양상을 관찰하기 위해 대조군(hADSC + Media
배양)과 실험군(hADSC + Osteogenesis differentiation media 배양)으로 나뉜 12 well
plate 하나를 꺼내 well 안에 들어있는 media 를 조심스럽게 micropipette 을 이용하여
suction 하였다. 그 후 media 성분이 염색 시약의 효과를 방해하는 것을 막기 위해
DPBS 용액을 각 well 에 1ml 씩 넣고 살살 흔들어준 뒤 씻어냈다. DPBS 용액을
micropipette 으로 부드럽게 suction 한 후, 세포 고정을 위해 4% PFA(Paraformaldehyde)
용액을 1ml 씩 각 well 에 주입하여 상온에서 20 분간 incubation 하였다. 그사이 Sigma-
Aldrich 사의 Alizarin Red S Powder(A5533) 1.36g 을 3 차 증류수 50ml 에 희석한 후
용액을 NH_4OH 로 적정하여 최종 Ph가 4.2가 되도록 적정한 뒤 syringe filter 을 이용해
작은 불순물까지 걸러준 뒤 호일로 싸서 보관하였다. 20 분간의 Incubation 이 완료된
후 PFA 을 micropipette 으로 조심스럽게 suction 한 후 3 차 증류수로 세 번에 걸쳐
washing 을 진행하였고 미리 만들어 둔 2%(80mM) Alizarin Red S 시약을 각 well 당
600ul 씩 가한 뒤 알루미늄 호일에 감싼 채 상온에서 30 분간 incubation 하였다.

마지막으로 다시 3 차 증류수에 세 번에 걸쳐 washing 을 진행하였고 3 차 증류수가 담긴 상태에서 광학현미경을 이용하여 촬영을 진행하였다.

[2018.12.19 진행] 대조군(hADSC + Media 배양)과 실험군(hADSC + Osteogenesis differentiation media 배양)으로 나뉜 남은 12 well plate 하나가 분화 배지에 넣어 둔 지 4 주차가 되는 날, 꺼내 위와 동일한 과정으로 Alizarin Red S staining 을 실시하였다.

<Table 2> 2%(80mM) Alizarin Red S Composition

Types	Compositions
2%(80mM) Alizarin Red S	Sigma-Aldrich a5533 Powder 1.36g, 3' DW 50ml, after then filtered followed by storage with aluminium coating

II-4. Differentiation of hADSC into Chondrocytes and Safranin O Red Staining

연골 분화도 골분화와 동일한 과정을 통하여 hADSC 를 추출하였다. hADSC 의 pellet 을 15ml conical tube 에 구하여 pellet culture 를 진행하였고 골분화와 마찬가지로 [2018.11.24]에 연골분화 배지로 갈아주기 시작하였다. 골분화와 동일한 일정으로 배양액을 교체해 준 뒤 [2018.12.12]에 4um 두께로 paraffin section 하여 아래의 과정인 Safranin O Staining 을 통하여 염색하였다.

[2018.12.12 진행] 15ml conical tube 에서 hADSC pellet 을 연골분화 배지에서 키운 지 3 주차가 되는 시기에 파라핀 블록 제작을 위한 세포 고정 과정을 진행하였다. 대조군(hADSC + media 배양)과 실험군(hADSC + Chondrogenesis differentiation media 배양)으로 나뉜 15ml conical tube 를 꺼내 먼저 micropipette 을 이용해 pellet 이 손상되지 않도록 조심스럽게 media 를 suction 하였다. Media 성분을 희석하기 위해 DPBS 을 이용해 washing 을 1 회 진행한 후 15ml conical tube 에 2.5ml 씩 4% PFA 을 가하여 고정을 완료한 뒤 4um 두께의 파라핀 블록을 제작하였다.

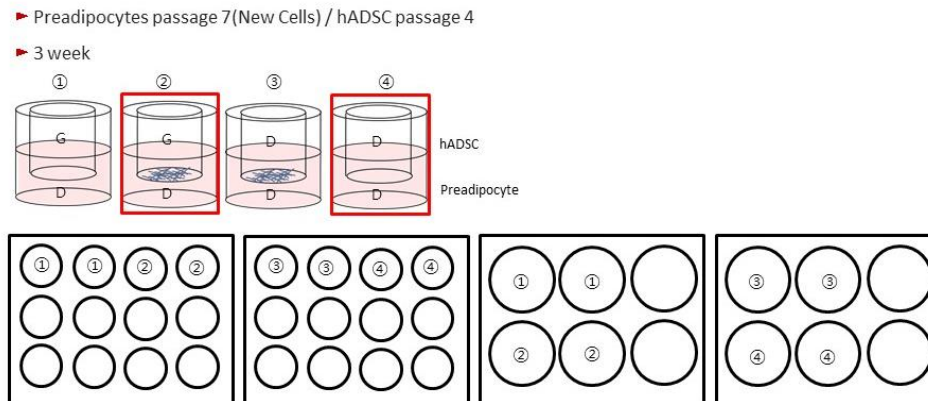
[2018.12.19 진행] 파라핀 블록 제작이 완성되고 난 후 실험실에서 deparaffinization 과정을 진행하였다. 먼저 제작된 파라핀 블록을 슬라이드 랙 위에 올려둔 후 convex dry oven 에서 20 분간 incubation 하여 파라핀을 녹였다. 그 사이 Sigma-Aldrich 사의 Safranin O Powder(S2255) 0.05g 을 3 차 증류수 50ml 에 희석한 뒤 syringe filter 로 걸러주어 0.1% Safranin O solution 을 제작하였다. Incubation 이 완료된 후 Fume hood 에서 xylene 에 5 분간 incubation 한 뒤 다시 새로운 xylene 용액에 5 분간 incubation 하여 파라핀을 제거하였다. 그 다음으로 각각 100% EtOH, 90% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH 용액에서 5 분, 5 분, 2 분, 10 분간 incubation 한 뒤 흐르는 수돗물에 10 분간 담가놓은 뒤 0.1% Safranin O solution 을 이용하여 슬라이드를 염색하였다. 마지막으로 95% EtOH 용액에 2 분간 두 번씩 염색된 슬라이드를 담근 뒤 Shindon 사의 Mountant 을 이용하여 mounting 한 후 광학현미경을 이용하여 hADSC 의 연골분화 양상을 관찰하였다.

<Table 3> 0.1% Safranin O Red Staining

Types	Compositions
0.1% Safranin O	Sigma-Aldrich S2255 Powder 0.05g, 3' DW 50ml, after then filtered followed by storage with aluminium coating

II-5. Coculture of hADSC on Preadipocyte cell lines and Oil Red O Staining

<Figure 1> Coculture of hADSC on preadipocyte cell lines. There are four experimental groups divided by presence of hADSC on coculture transwell and media compositions.



[2018.11.26 진행] 분리배양한 hADSC 를 transwell 에 preadipocyte 와 공배양하여 hADSC 의 paracrine signaling 을 알아보려고 하였다. <Figure 1>의 실험군에서 보이듯 6 well 과 12 well plate 의 두 well 에는 transwell 에 hADSC 를 넣지 않고 plate 에 preadipocyte 만 주입한 뒤 transwell 에는 control growth media, plate 에는 differentiation media 를 넣었고 남은 well 두 개에는 transwell 에 hADSC 를 넣고 실험을 진행하였다. 다른 6well 과 12 well plate 의 두 well 에는 transwell 에 hADSC 를 넣지 않고 plate 에 preadipocyte 만 주입한 뒤 transwell 과 plate 모두 differentiation media 를 넣었다. 남은

well 두 개에는 transwell 에 hADSC 를 공배양한 뒤 실험을 진행하였다. 아래 <Table

4>은 hADSC 를 preadipocyte cell line 에 공배양하여 지방분화를 시키기 위한 control

growth media 와 differentiation media 배지 조성이다.

<Table 4> Composition of control growth media and adipogenic differentiation media

Type	Compositions	Doses
Control Growth media	DMEM low glucose 44.5ml FBS 5ml Glutamax I 500ul Gentamycin 25~50ul	Transwell: 12well 0.5ml 6well 1.5ml
Adipogenic differentiation media	Adipocyte differentiation basal media 90ml Stempro adipocyte supplement 10ml Gentamycin 50ul	Transwell: 12well 0.5ml 6well 1.5ml Plate: 12well 1ml 6well 2.5ml

p6 preadipocyte cell line 150mm plate 한 개를 [2018.11.21]에 계대배양하여 p7 preadipocyte 150mm plate 세 개로 늘렸고 [2018.11.23]에 배양액 교체를 진행하였다. 그리고 12 well plate 와 6 well plate 의 면적을 고려하여 12 well plate 하나 당 4×10^4 cells 와 6 well 하나 당 8×10^4 cells 가 들어가도록 <Figure 1>의 모든 실험군의 plate 에 접종하였다.

[2018.11.01]에 isolation 하여 p4 까지 계대배양한 hADSC 150mm plate 5 개는 계대배양과 동일한 방법으로 harvest 하여 pellet 을 구한 뒤 각 plate 당 2ml 씩 media 를 가하여 resuspension 하였다. 그리고 10ul 씩 취하여 Triphan-Blue 10ul 와 dilution 하여 hemocytometer 로 세포 수를 측정하였다. 다음 12 well transwell 과 6 well transwell 의 각 transwell 의 면적을 고려하여 12 well transwell 하나 당 1.5×10^4 cells 와 6 well 하나 당 6×10^4 cells 가 들어가도록 <Figure 1> 중 해당하는 실험군(hADSC-preadipocyte growth media/differentiation media, hADSC-preadipocyte differentiation media/differentiation media)에 해당하는 transwell 에 접종한 뒤 아래의 과정인 Oil Red O Staining 을 통하여 염색하였다.

[2018.12.13 진행] hADSC 와 preadipocyte cell line 의 공배양을 시작한지 3 주차가 되는 [2018.12.14] 전 날 Sigma-Aldrich 사의 Oil Red O Powder(Sigma O0625) 0.4g 을

정량한 뒤 이를 Isopropanol 24ml, 3 차증류수 16ml 에 혼합하였다. 만들어진 solution 을 overnight 동안 heating, stirring 하여 incubation 하였다. 다음 날 syringe 를 이용하여 filter 한 뒤 호일로 싸서 상온에 보관하였다. <Table 5>은 1% Oil Red O work solution 을 만들기 위한 조성이다.

[2018.12.14 진행] 매일 대조군(Preadipocyte only)와 실험군(hADSC-Preadipocyte coculture)의 경과를 광학 현미경을 통해 관찰하였다. 공배양을 시작하고 분화 배지로 갈아준 지 3 주차가 되는 [2018.12.14]에 12 well plate 두 장의 media 를 micropipette 을 이용하여 조심스럽게 suction 하였다. 염색 전 Media 성분의 영향을 줄이기 위해 각 well 당 PBS 를 1ml 씩 투여하고 washing 하였고 다음으로 세포의 고정을 위해 4% PFA(Paraformaldehyde)을 각 well 당 1ml 씩 가한 뒤 상온에서 5 분 동안 incubation 하였다. PFA 을 다시 suction 한 뒤 새로운 PFA 를 뽑아 상온에서 40 분 동안 incubation 하였다. PFA 을 다시 suction 하고나서 60% isopropanol 을 1 회 주입한 뒤 살살 흔들어 washing 을 진행해주었다. 그 후 isopropanol 을 마저 suction 해주고 나면 isopropanol 의 성분이 완전히 사라질 수 있도록 15 분 정도 상온에서 건조시켰다. 미리 만들어놓은 Sigma-Aldrich 사의 1% Oil Red O Solution 을 Isopropanol 이 완전하게

건조된 12 well plate 에 600ul 씩 분주하였고 알루미늄 호일에 감싼 채 3 시간동안 incubation 하였다. 반응이 완료되었으면 마지막으로 3 차 증류수 1ml 씩 12 well plate 에 3 번 분주하여 천천히 흔들며 washing 을 반복하다가, 최종적으로 3 차 증류수 1ml 가 담긴 채로 광학현미경으로 지방 분화를 관찰하였다.

<Table 5> 1% Oil Red O Solution Compositions.

Types	Compositions
1% Oil Red O solution	Sigma-Aldrich O0625 Powder 0.4g, Isopropanol 24ml, 3' DW 16ml Overnight with stirring/heating, after then filtered followed by storage with aluminium coating

II-6. Real Time PCR(Stemness genes & Adipocyte Characteristic Markers)

<Table 6> Primer sequence designed for real-time PCR. The sequence is written from 5' to 3'.

Type	Gene	Forward Seq.	Reverse Seq.
Control	Human β - actin	TGAGAGGGAAATCGTGC GTG	TGCTTGCTGATCCACATCT GC
Stemness genes	Human Sox2	CCCACCTACAGCATGTCC TACTC	TGGAGTGGGAGGAAGAGG TAAC
Adipogenic differentiation marker	Human ADIPOQ	ATGGCAGAGATGGCACT CCT	CCTTCAGCTCCTGTCATTC CA
	Human CEBPA	AGGAAGTCCAGGCTGTC C	GTTAGCCATGTGGTAGGAG ACA
	FABP4	CCTTTAAAAAATACTGAG ATTTCCTTCA	GGACACCCCCATCTAAGGT T
	PPAR γ	GCGGCTGAGAAATCACG TTC	GAATATCAGTGGTTCACCG CTTC

Real-time PCR 을 통해 hADSC 와 공배양한 preadipocyte 의 지방분화를 확인하고자 하였다.

먼저 유전자 발현 양상을 확인하려 하는 cell line 으로부터 RNA isolation 을 하였다.

시작하기 전 깨끗한 호일을 실험대 위에 올려놓은 후 RNA isolation 위한 pipette 과 실험 도구들을 따로 준비하여 알코올 소독을 완료한 상태에서 실험을 진행하였다.

우선 media 를 suction 하고 PBS 를 이용하여 한 차례 media 성분을 washing 하였다.

PBS 를 pipette 을 이용하여 suction 하여 Trizol 1ml 가한 뒤 cell scraper 로 plate 바닥을 긁어 plate 바닥에 세포 덩어리가 보이지 않을 때까지 세포를 모아 1.5ml E-tube 에 담아 상온에서 10 분간 incubation 하였다. Trizol 을 통해 세포가 충분히 파괴되었으면 유기용매인 chloroform 200ul 을 가하여 상온에서 5 분간 incubation 한 뒤 10 초 정도 vortexing 또는 세게 흔들어준 후 12000rpm, 15 분간 원심분리하였다. 이때 cell lysate 가 3 층으로 분리되는데 상층은 RNA 를 포함한 투명한 수용액층, 중간층은 DNA 가 침전된 탁한 흰색 층, 마지막으로 하층은 유기물질이 존재하는 분홍색층으로 되어 있다. 원심분리가 완료되면 상층의 투명층 400ul 을 micropipette 으로 분리하여 따로 준비한 RNA isolation 용도의 E-tube 에 분리하였다. 그리고 Isopropanol 500ul 을 micropipette 으로 투명층이 들어간 E-tube 에 부드럽게 주입한 뒤 주입한 Isopropanol 과 투명층 사이에 아지랑이가 생성되는 것을 확인하였다. 이를 3 초 정도 inverting 하여 부드럽게 섞어준 후 상온에서 10 분간 incubation 하였다. 시간이 지난

후 불순물을 걸러주기 위하여 12000rpm, 15 분간 원심분리하였다. 그러나 원심분리 후에도 아래로 내려오는 RNA pellet 이 관찰되지 않아, 이전에 구한 cell lysate 를 다시 12000rpm, 15 분간 원심분리하여 상층의 투명층 150ul 을 뽑아 12000rpm, 15 분간 원심분리하였다. 원심분리한 두 개의 sample 의 상층액을 micropipette 을 이용하여 주의깊게 suction 한 뒤 75% EtOH in DEPC treated water 500ul 을 가해 부드럽게 inverting 해 준 후 두 sample 을 혼합하였다. 마지막으로 12000rpm, 15 분간 다시 원심분리해준 후 상층액을 따라 버리고 공기 중에서 완전히 말렸다. 일반적인 실험과 다르게 육안 상으로 RNA pellet 이 확인되지 않았으나 E-tube 에 DEPC water 40ul 을 주입하여 dilution 하였다. 최종적으로 Nanodrop 을 사용하여 RNA 의 concentration 과 purity 를 측정하였다.

<Table 7> RNA concentration and purity of preadipocytes classified by culture types and samples.

Type	Samples	Concentration(ng/ul)	260/280	260/230
		Mean Value	Mean Value	Mean Value
Control-Preadipocyte G/D	1	1537.835	1.84	0.665
	2	1090.97	1.75	0.5055

hADSC-Preadipocyte G/D	1	957.99	1.635	0.41
	2	879.86	1.625	0.415
Control-Preadipocyte D/D	1	1245.79	1.76	0.555
	2	1022.37	1.65	0.495
hADSC-Preadipocyte D/D	1	1412.02	1.645	0.645
	2	1108.205	1.555	0.53

Preadipocyte 로부터 RNA 를 분리한 다음 Real-time PCR 을 하기 위해 cDNA 를 합성해야 한다. ThermoScientific 사의 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 을 사용하였다. 우선 주변 실험대를 알루미늄 호일로 감싼 뒤 실험기구들을 알코올로 소독하고 실험을 진행하였다.

1.5ml E-tube 에 Nanodrop 으로 계산한 RNA 2ug, oligo Dt 1ul, 그리고 DEPC water(nuclease free water)가 총 12ul 가 되도록 넣었다. 샘플이 잘 섞이도록 부드럽게 흔든 뒤 짧게 원심분리한 후 65°C PCR machine 에서 5 분간 incubation 하였다. 다음 5x reaction buffer 4ul, 10Mm dNTP mix 2ul, RevertAid reverse transcriptase 1ul, RiboLock RNase inhibitor 1ul 을 순서대로 넣고 총 20ul 의 샘플을 만들었다. 샘플이 잘 섞이도록

부드럽게 흔든 뒤 짧게 원심분리한 뒤 42°C PCR machine 에서 1 시간 동안, 70°C heat block 에서 5 분간 incubation 하였다. 아래는 cDNA 합성을 마치고 효소의 반응을 종결시키는 단계이다. cDNA 합성이 완료되면 일주일 이내 사용할 경우 -20°C 냉동고에 보관하고 그 이상 보관하는 경우 -80°C deep freezer 에 냉동하였다.

앞서 합성한 cDNA 와 주문한 primer 를 이용하여 RT-PCR 을 진행하였다. 실험에는 TAKARA 사의 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 키트와 Applied Biosystems ViiATM 7 Real-Time PCR 기기를 사용하였다. 먼저 96 well PCR plate 에 다음의 구성에 맞춰 샘플을 로딩하였다. 각 well 마다 SYBR premix Ex Taq II 3ul, PCR forward primer 3.5ul, PCR reverse primer 3.5ul, template cDNA 3ul, ROX reference dye 0.4ul 로 총 10.4ul 의 샘플을 로딩하였다. 이때 cDNA 를 제외한 시약은 master mix 로 만들어주고 마지막에 cDNA 를 로딩하는 방식으로 수행하였다. 모든 과정은 얼음 위에서 진행하였다. 샘플을 모두 로딩한 다음 96 well PCR plate 를 ceiling 하여 real-time PCR 기기에 넣었다. <Table 8>에 제시된 조건을 이용하여 PCR 을 진행하였고 quantitative Ct analysis 을 기반으로 실험이 진행되었다.

<Table 8> Real-time PCR cycling conditions. The condition is optimized referring to the protocol used in the laboratory.

Real-time PCR run method			
Number of cycles=40(First two experiments) 50(third experiment), Starting cycle=1			
Stage	Step	Temperature	Time
Hold stage	1	50°C	2min
	2	95°C	10min
PCR stage	1	95°C	15sec
	2	62°C	30sec
	3	72°C	30sec
Melt curve stage	1	95°C	1min
	2	70 °C	30sec
	3	95 °C	30sec
	4	60 °C	15sec

II-7. Synthesis of Chondroitin Sulphate-based Whitlockite Demineralized Bone Matrix(DBM)

[2018.11.27 진행] 황산 콘드로이틴 기반 휘트록사이트 골충전재 생성 과정은 모두 서울대학교 공과대학 제 2 공학관에서 진행되었다. 먼저 휘트록사이트의 성분이 되는 Ca^{+2} 과 Mg^{+2} 을 정량하여 3 차 증류수에 고르게 섞어준 뒤 Heating mantle machine 의 magnetic stirrer 를 각각 350rpm 의 속도로 맞춘 후 저어주었다. 그 사이 인산을 8ml 과 증류수 250ml 을 섞어 혼합하였다. 이때 인산을 증류수에 한꺼번에 들이 붓는다면 급격한 중화반응으로 열이 생길 수 있으므로 조심스럽게 인산 4ml 을 넣고 증류수 125ml 을 넣은 후 다시 나머지 인산 4ml 와 증류수 125ml 을 섞어주었다. 다음으로, 작동하고 있는 Heating mantle 안에 인산 용액이 담긴 compressor 의 관을 연결해 준 후 heating mantle 의 Ca^{+2} 과 Mg^{+2} 에 compressor 에 연결된 $H_3PO_4^-$ 용액이 방울(drop)씩 섞이도록 한 뒤 overnight 로 제작하였다.

[2018.11.28] 다음 날 overnight incubation 된 whitlockite 를 고른 채로 잘 거른 후 50ml conical tube 로 옮겨담아 충분히 세게 흔들어준 후 1300rpm, 15 분간 원심분리하였다. 가라앉은 whitlockite pellet 을 제외한 상층액을 제거한 뒤 다른 conical tube 에 담긴

whitlockite 와 섞어서 충분히 세게 흔들어진 후 1300rpm, 15 분간 원심분리를
진행하였다. 그 사이 hot plate stirrer 위에서 chitosan 을 생성하였다. 위와 동일한
과정을 세 번 반복해 준 후 마지막으로 50ml conical tube 2 개의 총 100ml 의
whitlockite 를 생성하였다.

II-8. Quantitative Analysis of DBM: X-Ray Diffraction(XRD)

생성한 휘트로카이트(Whitlockite) 분말 생산물의 단위크기, 구조, 방향 등의 성분을 조사하기 위해 X-선 회절기를 통해 분석하였다. 서울대학교 기초과학 공동기기원의 분말 X-선 회절 분석기(Powder XRD)를 통해 X 선이 원자의 전자들에 의해 산란되면서 휘트로카이트 분말 결정상을 분석하였다.

II-9. Coculture of DBM on hADSC with osteogenic Differentiation Media

[2018.12.04 진행] 최종적으로 생성한 whitlockite 12ug 에 chitosan 12ug 을 정량한 뒤, chitosan 을 PBS 80ul 에 섞은 후 whitlockite 와 부드럽게 섞은 후 gelation 을 완료하였다.

[2018.12.06 진행] Gelation 한 Whitlockite 와 Chitosan 조합의 hydrogel 을 이용하여 hADSC 와 공배양하려고 하였다. 먼저 [2018.11.01] isolation 한 p4 hADSC 를 12well plate 의 well 6 개에 각 well 마다 2×10^4 cells 씩 깔고 media 1ml 을 가하였다. 이후 hADSC 가 플라스틱 plate 에 부착하여 자라며 형태학적인 변화가 나타나는 것을 확인한 뒤 [2018.12.09]에 hADSC 의 배지를 앞서 언급되었던 골분화 배지로 갈아준 후 transwell 위에 II-7 에서 제작한 hydrogel 을 공배양하였다.

II-10. Live & Dead Staining

[2018.12.10 진행] Hydrogel 을 골분화 배지가 담긴 hADSC 에 공배양한 지 24 시간이 지나는 날 Live & Dead Staining 을 진행하기 위한 시약을 만들었다. 시약으로 Molecular Probes 사의 Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kits for Mammalian Cells 을 사용하였다. 우선 Live/Dead Kit 을 녹인 뒤, D-PBS 10ml 안에 2mM EthD-1 을 20ul 가하여 4uM 의 EthD-1 solution 을 만들었다. 다음으로 4mM Calcein AM 을 5UI 정도 만들어놓은 10ml EthD-1 solution 주입하고 vortexing 을 통해 충분히 섞어주어 결과적으로 2uM calcein AM 과 4uM EthD 의 solution 을 만들었다.

12 well plate 의 hADSC 가 들어간 well 2 개 중에서 대조군(control)과 실험군(hydrogel coculture) 각각 한 well 에 Live/Dead reagent 를 200ul 씩 가하였다. 그 후 상온에서 1 시간 동안 incubation 한 뒤, 불이 차단된 암실에서 도립 형광 현미경을 이용해 Live/Dead 염색 결과를 확인하였다.

[2018.12.11 & 2018.12.12 진행] 마찬가지로 공배양하는 지 48시간과 72시간이 되는 날 형광 현미경을 이용해 Live/Dead 염색 결과를 확인하였다.

<Table 9> Live/Dead dilution composition

Types	Compositions
Live/Dead dilution solution	20uL of 2mM EthD-1 solution, 5uL of 4mM calcein AM solution in 10ml of sterile, tissue culture-grade D-PBS with sufficient vortexing

III. Results

III-1. Isolation and Culture of Human Adipose Derived Stem Cells(hADSC)

인체 유래물 연구 동의서를 받은 수술받은 환자의 절제된 지방 조직을 받아 2018 년 11 월 1 일 hADSC 를 분리하였다. 분리한 hADSC 를 배양하면서 매일 40 배의 광학 현미경을 이용하여 줄기세포의 상태를 점검하였다. 세포가 충분히 자라났을 시에 계대배양하여 플레이트 안에 세포가 겹겹이 자라는 것을 막고 새로운 플레이트에 키웠으며 여분의 줄기세포를 보관하기 위하여 cryotube 에 hADSC 를 저장하여 -80°C deep freezer 에 동결보관한 후 다음날 액체 질소 탱크에 넣어 stock 을 확보하였다. 분리배양한 hADSC 는 flowcytometry 를 진행하여 중간엽 줄기세포로서 특징적인 표면 항원을 발현하는지 검증하고자 하였다. hADSC 는 주변의 세포와 함께 성장인자, 항세포사멸물질, 혈관생성물질들을 공유하며 뾰족하게 줄기를 뺏고 나가는 특징적인 모양을 갖는다. 10 주 간 hADSC 를 관찰하면서 시간이 지나면서 세포는 주변 세포와 상호 교환하면서 증식 하나 passage 에 따라 뺏는 줄기의 양상이 초기 단계의 줄기세포에 비해 두꺼워지고 증식 속도도 감소하였다.

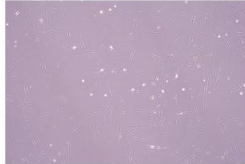
<Figure 2> Morphologic changes of isolated hADSC through its passages. The hADSC cultured on 100/150mm plate with DMEM solution (10% FBS, 1% P/S) was observed and captured at 40 × magnitude

hADSC Isolation & Culture

[2018.11.06] P1



[2018.11.09] P2



[2018.11.19] P3



[2018.11.27] P4



[2018.11.29] P5



III-2. Characterization of Adipose Derived Stem Cells: Flowcytometry

인간 지방 조직에서 분리한 hADSC 를 6 종류의 중간엽 줄기세포 표면 항원(CD19, CD34, CD44, CD90, CD105, HLA-DR)의 발현 여부를 확인하였다. 대조군으로 항체를 넣지 않은 Unstain 과 Ig-G1(CD19, CD34, CD90, CD105 control), Ig-G2A(HLA-DR control), Ig-G2B(CD44 control)을 사용하였다.

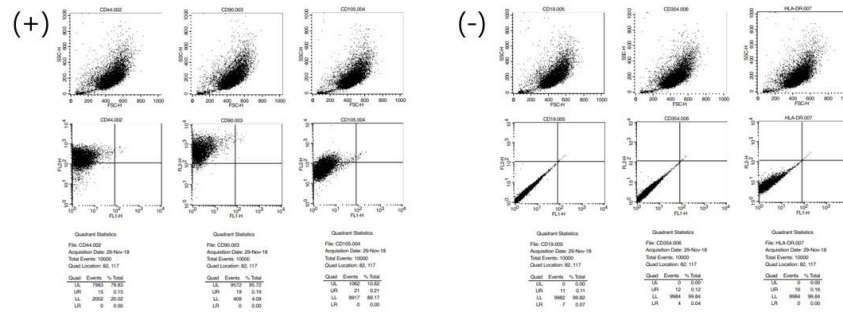
실험 결과 hADSC 에서 CD44(79.83%), CD90(95.72%)에 대해 positive, CD105(10.62%)에 대해 weak positive, CD19(0.00%), CD34(0.00%), HLA-DR(0.00%)에 대해서 negative 를 띄었다. 이는 hADSC 가 임상에서 이용될 때 Flowcytometry 기술이 세포를 감별하는데 도움이 될 수 있음을 보여준다.

<Figure 3> Confirmation of MSC surface markers of hADSCs(P5).

(A) Analysis of positive(CD44, CD90, CD105) and negative(CD19, CD34, HLA-DR) markers of FACS assay. hADSCs stained with CD19, CD90, CD105 were stained with Ig-G1. hADSCs stained with CD34, CD44, HLA-DR were stained with Ig-G2A and Ig-G2B.

hADSC FACS

[2018.11.29] Passage Number 5



(B) Summarization of FACS results from P5 hADSCs

Flowcytometry

Group/Surface marker	CD44	CD90	CD105	CD19	CD34	HLA-DR
hADSC Isolation	79.83%	95.72%	10.62%	0.00%	0.00%	0.00%

III-3. Osteogenic & Chondrogenic Differentiation of hADSCs

hADSC 와 같은 중배엽 기원으로의 분화능을 확인하고자 연골분화와 골분화를 관찰하려고 하였다. [2018.10.10]에 stock 한 p6 hADSC 를 키워 p7 에서 연골분화와 골분화로의 분화를 진행하였다. 두 가지 배양 조건(hADSC on growth media, hADSC on differentiation media) 아래에서 hADSC 가 각각 골세포와 연골세포로 분화하는데 어떤 차이가 있는지 알아보려고 하였다. 아래는 hADSC 의 p6 와 p7, 그리고 분화를 주기 바로 전 상태의 세포를 40 × 광학현미경으로 관찰한 사진이다.

<Figure 4> Morphologic changes of hADSC through its passages. It was isolated 2018.10.10

hADSC Isolation & Culture 2



hADSC의 골세포로의 분화능을 확인하기 위해 하루 간격으로 분화과정을 40×배 광학현미경으로 관찰하였고 3주차와 4주차가 되는 날 Alizarin Red Staining을 진행하여 40×와 100×배 광학현미경 아래에서 대조군(hADSC on growth media)과 실험군(hADSC on osteogenic differentiation media)의 차이를 관찰하였다. 염색을 하지 않은 상태의 광학현미경으로 보아도 대조군에 비해 갈색의 hADSC 돌기 끝을 따라 갈색의 동글동글한 골세포가 분화하였고 3주차에 비해서 4주차에 더 많은 골세포를 관찰할 수 있었다.

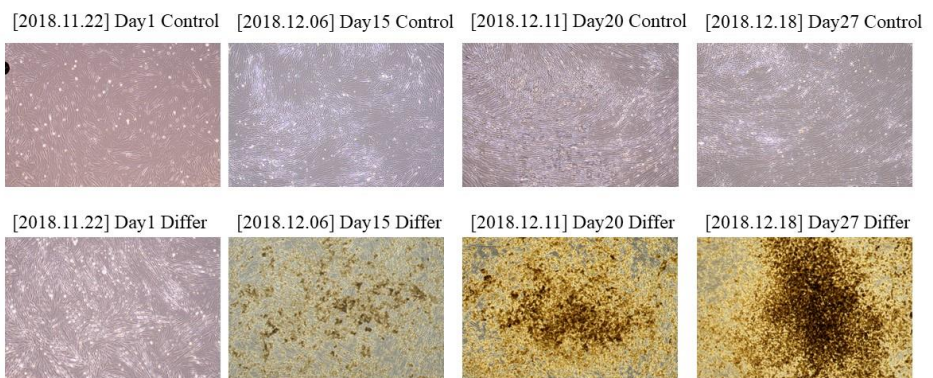
골분화를 더 자세하게 관찰하기 위해 실시한 Alizarin Red Staining의 결과 실험군에서 대조군에 비해 골분화가 확연하게 일어난 것을 확인할 수 있었고, 이는 3주차에 비해서 4주차에 더 두드러지는 것을 관찰할 수 있었다.

연골분화를 확인하기 위한 Safranin O Red Staining에서도 두드러지지지는 않았지만 대조군(hADSC pellet on growth media)에 비해 실험군(hADSC pellet on chondrogenic differentiation media)에서 연골분화가 두드러지는 것을 확인할 수 있었다.

<Figure 5> Confirmation of osteogenesis and chondrogenesis of hADSCs(P7) cultured in their own differentiation media. The following are optical photographs of control group (growth media), experimental group (differentiation media), Alizarin Red staining and Safranin O staining.

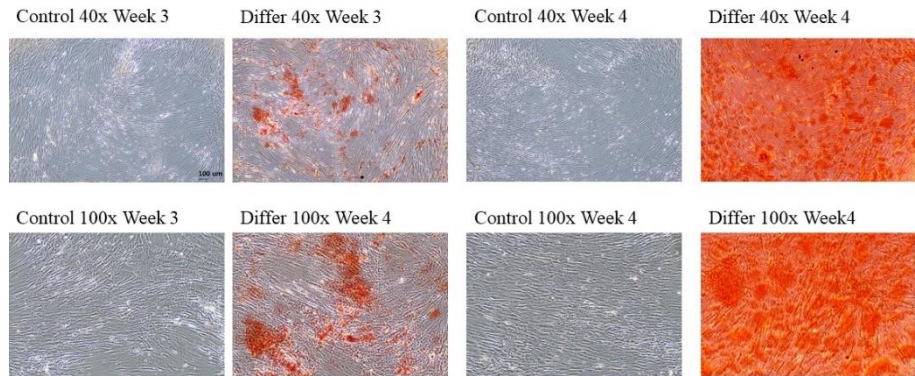
(A) Optical photographs of control group (growth media) & experimental group (differentiation media). They are cultured in 12 well plate in 2 wells, which are duplicated in another plate.

Osteogenic Differentiation



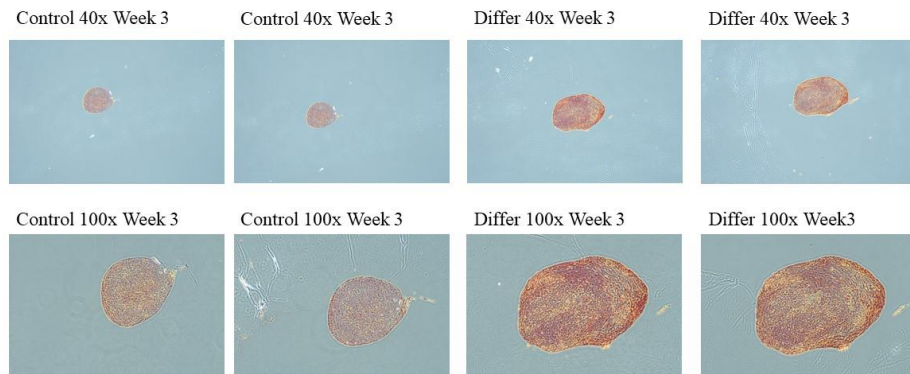
(B) Optical Photographs of control group(growth media) and experimental group(osteogenic differentiation media) which are stained by Alizarin Red. Week 3 & Week 4.

Alizarin Red Staining



(C) Optical photographs of control group(growth media) and experimental group(chondrogenic differentiation media) which are stained by Safranin O. They are cultured in 15ml conical tube by pellet culture. Media was changed every 3~4 days. They have gone through 3week of differentiation.

Safranin O Staining



결론적으로 Alizarin Red, Safranin O Red staining 두 가지 기법을 사용해 hADSC의 증배엽 기원의 골세포와 연골세포의 분화를 관찰한 결과 적절한 분화 배지 조건 아래에서 hADSC의 골세포와 연골세포의 분화가 유의미하게 촉진됨을 확인하였다.

III-4. Adipogenic Differentiation of hADSC by Paracrine Signaling

hADSC 자체의 증식과 분화가 아닌, hADSC 가 분비하는 물질에 의해서 증식과 분화가 이루어지는 주변 분비 효과를 알아보기 위하여 Preadipocyte 를 각각 12well 과 6well plate 두 개에 주입하였고 이에 hADSC 가 미치는 영향을 알아보려고 하였다. [2018.11.01]에 분리배양한 hADSC 를 사용하였으며 공배양하는 hADSC 의 유무뿐 아니라 transwell 과 plate 에 주입하는 배양액의 조합을 달리하여 4 가지의 실험군(실험군 1: Control with growth media on transwell and differentiation media on plate, 실험군 2: hADSC coculture with growth media on transwell and differentiation media on plate, 실험군 3: Control with differentiation media both on transwell and plate, 실험군 4: hADSC coculture with differentiation media both on transwell and plate)으로 hADSC 의 주변 분비 효과를 확인하고자 하였다. 시각적으로 확인하기 위해 Oil Red O staining 을 하였고 이의 500nm 아래에서 OD 값을 이용하여 preadipocyte 의 adipocyte 로의 분화도가 어떠한 차이를 보이는지 정량적으로 분석하고자 하였다. 또한 RT-PCR 을 이용하여 hADSC 와 공배양한 preadipocyte 가 지방 분화를 이루었는지 지방 특이 마커를 확인하고, hADSC 에서 발현되는 줄기세포 특정 항원도 함께 확인하고자 하였다.

하루 간격으로 각기 다른 실험 조건(실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4) 하의 세포 상태를 40× 광학현미경으로 관찰하였다. 모든 실험군에서 시간이 지나면서 동그란 거품 모양의 지방 덩어리를 생성하는 것을 관찰할 수 있었다. 육안적으로 growth media 에서 hADSC 를 키워 preadipocyte 와 공배양한 실험군 2 에서 가장 지방분화가 두드러지는 것을 확인하였다.

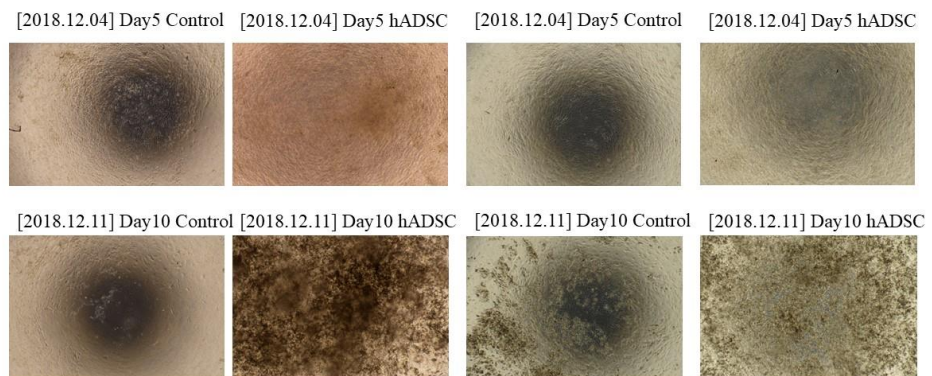
Preadipocyte 의 지방으로의 분화를 더 자세하게 관찰하고자 진행한 Oil Red O staining 에서도 마찬가지로 실험군 2 에서 지방분화가 가장 활발한 것을 관찰할 수 있었다.

이를 정량적으로 확인하고자 500nm 의 빛 아래에서 분화된 지방의 흡광도를 측정하였다. 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3, 실험군 4 의 500nm 흡광도가 0.192, 0.276, 0.192, 0.238 로 측정되었다. 이는 Oil Red O staining 을 기준으로 preadipocyte 의 지방세포로의 분화가 일반 배양액에서 자란 hADSC 와 공배양하였을 때 그러지 않았을 때보다 1.438 배, 일반 배양액에서 자라지 않은 hADSC 와 공배양하였을 때보다 1.160 배 증가함을 의미한다.

<Figure 6> Adipogenesis of preadipocytes. There are four experimental groups. They are cultured in 12 well plate and 6 well plate, all of whose transwell are set up. Experimental group 1: control media on empty transwell with differentiation media on the plate. Experimental group 2: control media on hADSCs with differentiation media on the plate. Experimental group 3: differentiation media on empty transwell with differentiation media on the plate. Experimental group 4: differentiation media on hADSCs with differentiation media on the plate.

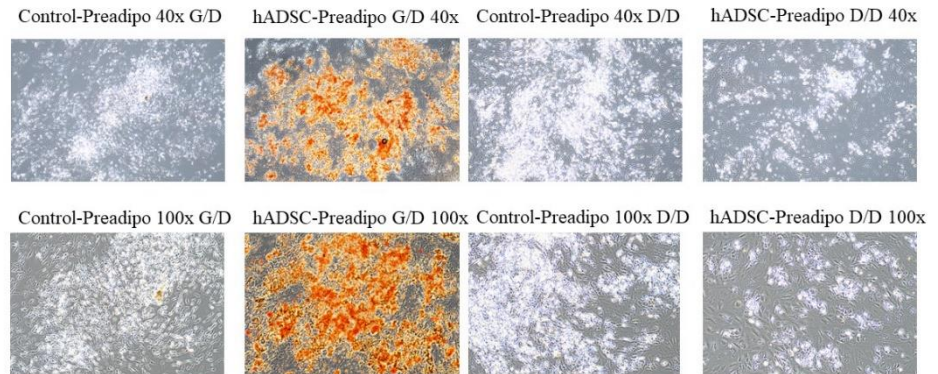
(A) Optical photographs of experimental group 1~4. Group 1 has empty transwell with control media & plate with differentiation media. Group 2 has hADSCs on transwell with control media & plate with differentiation media. Group 3 has empty transwell with differentiation media & plate with differentiation media. Group 4 has hADSCs on transwell with differentiation media & plate with differentiation media

Adipogenic Differentiation



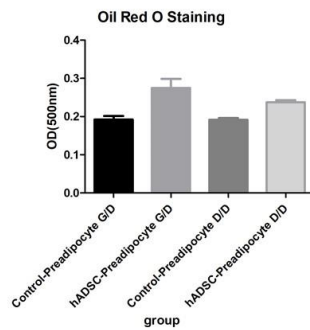
(B) Optical photographs of experimental group 1 & group 2 in Oil Red O staining. Oil Red O stains red when in contact with adipocytes

Oil Red O



(C) After Oil Red O is destained from the 12 well plate, OD absorbance was measured with 200nm light.

Oil Red O Absorbance



(D) Summarization of OD absorbances after Oil Red O stain

Oil Red O Absorbance

Group	Control-Preadipocyte G/D		hADSC-Preadipocyte G/D		Control-Preadipocyte D/D		hADSC-Preadipocyte D/D	
	1	2	1	2	1	2	1	2
OD(500nm)	0.176	0.207	0.315	0.236	0.186	0.198	0.231	0.245
OD(500nm) average	0.192		0.276		0.192		0.238	

마지막으로 네 종류의 실험군(Control with G/D media, hADSC coculture with G/D media, Control with D/D media, hADSC coculture with D/D media)의 preadipocyte 에 대해서 real-time PCR 을 통해 지방에 특징적인 분화 마커인 hADIPOQ, hCEBPA, hFABP4, hPPAR γ 의 발현 양상을 측정하고 hADSC 의 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 대표적인 유전자인 hSOX2 의 발현 양상을 분석하였다. 각 유전자마다 다른 상대적인 발현 양상을 비교하기 위해 housekeeping gene 인 h- β -actin 을 internal control 로 삼았고 각 실험군마다 발현 양상의 차이를 확인하기 위해 실험군 1 을 negative control 로 채택하였다. SYBRTM Green 을 통해 real-time PCR 의 발현 모습을 실시간을 관찰하고 측정된 값은 C_T 값과 $\Delta\Delta C_T$ 값을 기반으로 계산하고 분석하였다.

먼저 <Figure 7>-(A)에서 볼 수 있듯이 일반 growth media 에 hADSC 를 키워 preadipocyte 의 지방으로의 분화를 유도한 실험군 2 의 adipogenic marker(hADIPOQ,

hCEBP, hFABP4, hPPAR γ)의 C_T 가 다른 실험군들의 C_T 값에 비해 모두 값이 낮은 것을 확인할 수 있다. 네 실험군 모두 h- β -actin 의 값(17.847, 17.895, 18.205, 18.422)이 비교적 비슷할 때, control 일 때보다 hADSC 를 coculture 한 실험군에서 adipogenic marker 의 값이 더 일찍 뜨는 것을 확인할 수 있다. 그러나 preadipocyte 에서 대표적인 stemness marker 인 모든 실험군에서 hSOX2는 유의미하게 값이 나타나지 않은 것으로 보아 hADSC 자체의 증식과 분화에 의해 지방 분화가 이루어진 것이 아니라 공배양하는 hADSC 의 분비체가 transwell 을 타고 내려가 지방분화에 관여하였음을 알 수 있었다.

다음으로 $\Delta\Delta C_T$ 값을 기반으로 preadipocyte 의 지방세포로의 분화도가 유의미한 차이를 보이는지 분석하고자 하였다. 그러나 <Figure 7>-(B), (C)에서 확인할 수 있듯이 각기 다른 adipogenic marker 마다 서로 상이한 그래프 크기와 수치를 보이는 것으로 보아 확실한 비교는 어려워 보였다.

결론적으로 Oil Red O staining 과 Real-time PCR 을 이용한 C_T 값을 통해 preadipocyte 의 지방세포로의 분화도를 측정 한 결과 preadipocyte 가 지방 세포로

분화할 때 hADSC 가 첨가되면 분화가 유의미하게 증가함을 관찰할 수 있었다.

hADSC 에 differentiation media 등을 주어 변화를 유도하지 않고 growth media 만 첨가하여 preadipocyte 와 공배양하는 것은 Oil Red O staining 의 OD 값과 Real-time PCR 의 C_T 값에는 영향을 주는 것을 확인할 수 있었으나 $\Delta\Delta C_T$ 에는 primer 마다 다른 양상을 보여 직접적으로 비교할 수 없었다. 따라서 두 실험 결과를 통해 hADSC 의 주변 분비 효과를 통해 preadipocyte 의 지방 분화가 분명히 증가할 수 있음을 확인하였으며 그 효과는 hADSC 에 differentiation media 를 넣어 변화를 유도하지 않고 일반 배양액을 넣었을 때 나타나는 것이 보였다.

<Figure 7> Analysis of stemness gene(hSOX2) and adipogenic differentiation marker(hADIPOQ, hCEBPA, hFABP4, hPPAR γ).

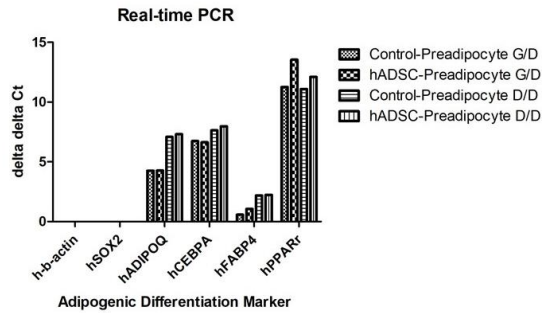
(A) C_T value of each of the markers according to the four experimental groups. h- β -actin was used as the internal control

Sample Name	Target Name	C_T	Sample Name	Target Name	C_T
Control+Preadipocyte G/D	h-b-actin	17.847	Control+Preadipocyte G/D	hCEBPA	24.083
hADSC+Preadipocyte G/D		17.895	hADSC+Preadipocyte G/D		23.971
Control+Preadipocyte D/D		18.205	Control+Preadipocyte D/D		24.962
hADSC+Preadipocyte D/D		18.422	hADSC+Preadipocyte D/D		25.250

Sample Name	Target Name	C_T	Sample Name	Target Name	C_T
Control+Preadipocyte G/D	hSOX2	-	Control+Preadipocyte G/D	hFABP4	18.330
hADSC+Preadipocyte G/D		-	hADSC+Preadipocyte G/D		18.396
Control+Preadipocyte D/D		-	Control+Preadipocyte D/D		21.663
hADSC+Preadipocyte D/D		-	hADSC+Preadipocyte D/D		19.543

Sample Name	Target Name	C_T	Sample Name	Target Name	C_T
Control+Preadipocyte G/D	hADIPOQ	21.594	Control+Preadipocyte G/D	hPPAR γ	31.641
hADSC+Preadipocyte G/D		21.330	hADSC+Preadipocyte G/D		28.958
Control+Preadipocyte D/D		24.413	Control+Preadipocyte D/D		32.552
hADSC+Preadipocyte D/D		24.540	hADSC+Preadipocyte D/D		30.411

(B) Graph of $\Delta\Delta C_T$ value according to each of the experimental group



(C) $\Delta\Delta C_T$ value according to the four experimental groups

Group/Gene	h-b-actin	hSOX2	hADIPOQ	hCEBPA	hFABP4	hPPAR α
Control- Preadipo G/D	0	-	4.257	6.736	0.569	11.258
hADSC- Preadipo G/D	0	-	4.267	6.634	1.059	13.543
Control- Preadipo D/D	0	-	7.076	7.625	2.181	11.091
hADSC- Preadipo D/D	0	-	7.309	7.963	2.230	12.112

III-5. Quantative Analysis of DBM by X Ray Diffraction(XRD)

황산 콘드로이틴에 붙어 hADSCs 의 자가 이식의 계대(scaffold)로 작용할 구조를 휘트로카이트로 결정하였고, <Figure 8>은 제작한 휘트로카이트 분말을 서울대학교 기초과학 공동기기원의 Powder XRD 기기를 이용하여 성분을 분석하였다.

X 선이 휘트로카이트 결정 원자의 전자들에 의해서 산란되는 과정에 의해서 각기 다른 각도에 따라 세기가 측정되었고 이에 따라 상이 분석되고 제작한 휘트로카이트 결정에 함유되어 있는 성분이 조사되었다. X 선 회절 분석 결과 휘트로카이트에는 100% 휘트로카이트가 함유되어 있어 하이드로겔(hydrogel)을 만들 준비가 되었다고 판단하였다.

이는 X 선 회절 분석이 앞으로의 황산콘드로이틴 기반 휘트로카이트 골충전재 합성을 위한 도구로 유용하게 쓰일 수 있음을 암시한다.

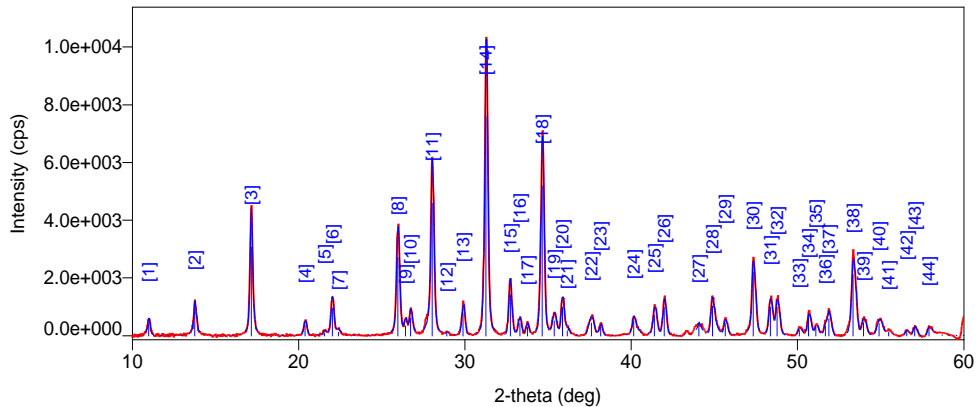
<Figure 8> Quantative and phase analysis of whitlockite.

- (A) Quantative analysis results of synthesized whitlockite. Weight ratio says synthesized whitlockite has 100% content of whitlockite

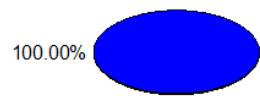
Quantitative Analysis Results (WPPF)


General information			
Analysis date	2018/02/19 14:29:09	Measurement date	2018/02/19 13:44:18
Sample name		Operator	Administrator
File name	WH2_1.ras		
Comment			
Qualitative analysis results			
Phase name	Formula	Phase reg. detail	DB card number
Whitlockite, syn	Ca18 Mg2 H2 (P O4)14	ICDD (PDF-2 Release 2016 RDB)	01-070-2064
Weight ratio			
	Phase name	Content(%)	
-	Whitlockite, syn	100.0(11)	

- (B) Phase analysis of whitlockite. X-Ray diffraction machine measured the intensity of reflected X rays by electrons from different angles



- (C) Content of the synthesized whitlockite. 100% whitlockite



Whitlock..., syn(%) 

III-6. Cell Viability of hADSC on Chondroitin Sulphate-based Whitlockite

임상에서 황산 콘드로이틴 기반 휘트로카이트 골충전재를 생체활성형 상태에서 이용하여 골분화를 유도하는 hADSC 와 시너지 효과를 알아보려면 Live & Dead staining 을 통해 세포 생존능 분석의 필요성이 있었다. 따라서 2018 년 11 월 01 일 분리하여 stock 한 p4 hADSC 를 풀어 12 well plate 의 well 6 개에 주입하였고 하루 간격으로 40 × 광학현미경으로 관찰하면서 세포가 플라스틱 plate 에 부착이 완료되었음을 확인하였고, 골분화 유도 배지로 배양액을 교체한 후 황산 콘드로이틴과 휘트로카이트를 섞은 hydrogel 과 공배양하여 Live & Dead staining 을 진행하였다.

Live & Dead staining 결과 hydrogel 과 공배양한 24 시간, 48 시간, 72 시간동안 hADSC 의 유의미한 세포 생존능을 관찰할 수 있었다. 50 ×, 100 × 형광현미경에서 세포를 관찰하여 기록하였고 이를 <Figure 9>에서 찾을 수 있다. 살아있는 세포를 염색하는 FITC 는 초록색으로 넓게 염색된 것을 확인할 수 있었지만, 24 시간, 48 시간,

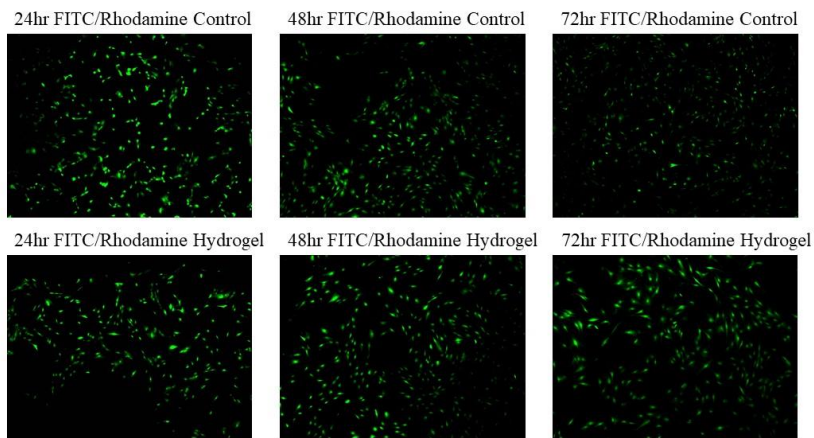
72 시간에도 죽은 세포를 염색하는 Rhodamine 의 빨간색은 형광 현미경 어디로도 찾을 수 없었다.

결국 인체에 존재하는 재료인 키토산과 생체 활성을 떨 수 있는 휘트로카이트의 조합이 예상했던 대로 hADSC 와 시너지 효과를 내어도 cell viability 를 유지할 수 있음을 확인하였고, 이는 추후 ALP, ARS 염색 등 골분화 효과 연구와 동물과 임상 연구를 통해서 발전할 수 있음을 시사한다.

<Figure 9> Live & Dead staining of hADSCs. In the control group hADSCs were only cultured in osteogenic differentiation media, however the in the hydrogel group hADSCs were cultured in osteogenic differentiation media with hydrogel cocultured.

(A) Live/Dead staining of the control group and hydrogel group. They were observed in 24hr, 48hr, 72hr after hydrogel was cocultured in the hydrogel group. The photographs show optical + FITC stain + Rhodamine stain, FITC stain + Rhodamine stain.

Live & Dead Staining



IV. Discussion

10 주간 hADSC 를 분리, 배양, 저장하는 법을 배울 수 있었다. Passage 를 거치면서 광학 현미경 상에서 나타나는 hADSC 의 형태학적 특징의 소실, 증식 속도의 감소, 두 가지를 관찰하였다고 하였으나 이를 정량화하지는 못하였다. Passage 에 따라서 객관적으로 hADSC 의 형태학적인 특징과 증식 속도가 변화하는지 추후 연구가 필요할 것이다. 뿐만 아니라 광학 현미경 상에서 보이지 않지만 내재된 줄기세포성의 변화, 분화능, 혈관 생성능 등을 수치 상으로 기록할 수 있도록 해야할 것이다.

<Figure 3>의 hADSC 의 MSC surface marker 를 분석한 Flowcytometry 에서 다른 학술 자료에서는 50% 정도 이상을 띄는 CD105 마커가 이번 연구에서는 10% 정도의 weak positive 를 나타내었다. 게다가 Negative surface marker 가 0.00%에 수렴하는 값을 나타냈음에도 불구하고 Positive Marker 는 강하게 띄지 않은 것으로 보아 이는 FACS sample 을 준비하는 단계에서 세포 생존능이 충분히 유지되지 않았기 때문이라고 생각된다. 또한 P5 로 Flowcytometry 를 진행하기에는 비교적 높은 단계의 hADSC 이었으므로 FACS 결과가 다른 학술자료들과 다르게 나왔을 것이라고 생각되나, 추후 Flowcytometry 의 hADSC 감별이라는 임상적인 역할을 바라볼 때

Passage 에 따른 hADSC 의 특성 변화와 함께 Marker 의 발현 양상을 바라보는데 분석적으로 접근 해야할 것이다.

<Figure 5>의 hADSC 의 분화 유도 배지 아래에서 연골분화와 골분화 양상을 보고 hADSC 의 분화능을 확인할 수 있었으나 구체적인 시간에 따른 분화 정도 정량적으로 분석하지 못하였다. 추후 임상 적용에 앞서 hADSC 의 효능을 평가하기 위해 염색을 destain 한 후 흡광도를 측정하는 방식으로 정량화되어야 할 필요가 있을 것이다.

<Figure 7>의 RT-PCR 결과에서 transwell 과 plate 에 control growth media 와 differentiation media 가 투여된 12 well 에서 hADSC 와 공배양한 preadipocyte 의 공배양하지 않은 preadipocyte 에 비해 지방 분화가 비교적 뚜렷하게 이루어진 것을 이르게 나타난 C_T 을 통해서 확인할 수 있었으나, $\Delta\Delta C_T$ 값에서는 각 실험군 별로 상이한 변화를 찾기 힘들어 지방 분화의 정도와 효과를 정량적으로 수치화할 수 없었다. hADSC 의 주변 분비 효과에 의해서 preadipocyte 의 지방 분화가 이루어지는 것을 파악하기는 하였으나, 이를 정량화 하지 못했다. 추후 임상에 적용하기 앞서 시간에 따라서 지방으로의 분화를 관찰하고 이를 다시 수치화한 검증이 요구될 것이다.

<Figure 9>의 Live/Dead staining 을 통해 황산 콘드로이틴 기반 휘트로카이트 골충전재(DBM)가 hADSC 와 함께 하는데 있어서 공존 가능성을 엿볼 수 있었다. 그러나 골충전재(DBM)가 hADSC 와 결합하여 골분화에 있어서 추후 ARS, ALP 염색 등을 통해 어느 정도의 시너지 효과를 내는지 정량화되어야 할 필요가 요구된다고 생각되고 또한 동물실험과 임상 실험을 통해서 생체 활성형인 골충전재가 어떤 효과와 부작용을 나타내는지 검증해야할 것이다.

인간 지방유래 줄기세포는 세포 수가 기존의 골수 유래 중간엽 줄기세포에 비해 풍부하고 공여자의 고통을 동반하지 않는데다 쉽게 접근가능하며 부작용도 적다. 뿐만 아니라 25 Passage 가 지나도 면역표현형을 유지하면서 증식하고 분화할 수 있는 잠재력도 가지고 있다. 이는 인간 지방유래 줄기세포가 향후 질병이나 외상으로 손상된 결손부에 있어서 이상적인 줄기세포 공급처가 될 수 있음을 말해주며 이를 활용한 미래 임상 적용에서의 전망은 매우 밝다고 할 수 있다.

허나 임상에 적용하기 앞서 수확한 줄기세포를 어떻게 하면 효과를 늘리고 부작용을 최소화할 수 있을 지에 대한 깊은 관심이 필요할 것이다. 본 연구를 통해서 Flowcytometry, osteogenesis, chondrogenesis, hADSC-preadipocyte coculture, Chondroitin Sulphate Based Whitlockite DBM 등의 실험들을 통해서 인간 지방유래

줄기세포가 임상에서 어떻게 활용될 수 있는지 본 연구는 다음의 결론을 제안한다. 먼저 임상 적용에 앞서 인간 지방유래 줄기세포성을 확인할 수 있는 Flowcytometry 를 활용할 수 있으나 이 결과는 실험 재료와 과정에 따라 상당한 variation 을 가지고 있다. 이를 본격적으로 사용하기 전에 더 높은 발현 양상을 나타내는 표면 항원을 찾는 노력과 Passage 에 따른 줄기세포의 특성 변화에 대해서 후속 연구가 필요할 것이다.

다음으로 줄기세포 자체의 증식과 분화에 의한 자가 조직 이식이라는 이상적인 방법도 있지만, 주변 분비 효과를 통해 확인했듯이 줄기세포 자체가 아닌 그들이 분비하는 물질에 대한 후속 연구도 진행되어야 할 것이다. 이는 줄기세포 치료에 있어 새로운 패러다임을 가져다주는 것으로, 줄기세포로서의 치료 효과를 나타내는 물질을 분리할 수 있다면 줄기세포를 직접 주입하지 않더라도 유효한 성분을 환자에게 적용하여 치료 효과를 기대할 수 있을 것이다. 본 연구와 더불어 앞으로 줄기세포가 주변 분비 효과와 분비체에 대한 연구가 적극적으로 이루어진다면 환자를 위한 더 활발한 치료 방법이 개발될 수 있을 것이다.

마지막으로 줄기세포와 분비체를 이용한 치료 방법뿐 아니라 그 효과를 증가시킬 수 있는 생체공학에 대한 연구가 이루어진다면 임상현장에서 더 다양한 방향으로 치료가 진행될 수 있을 것이다

V. References

- 인간 지방조직에서 분리된 줄기세포의 표면항원 및 다분화능 확인. 조혜경. 대한임상검사학회지. 2008
- 지방기질유래 줄기세포의 골 분화 시 성장인자의 효과. 김옥규 외 3 인. Journal of Korean Oral Maxillofacial Surg. 2006
- 지방줄기세포의 특성과 임상적 응용. 이종원. Journal of Korean Med Assoc. 2012
- 지방조직 유래 중간엽 줄기세포의 세포군별 분리. 박수정 등 Journal of Korean Burn Society. 2011
- 지방유래 중간엽줄기세포. 정진섭. The Journal of the Korean Society for Transplantation. 2008
- Adipobiology of Stem Cell Based Therapy: Secretome Insight. Journals mu-vama. AB Tonchev et al. 2010.
- Isolation, Culturing, Characterization and Aging of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells: A Brief Overview. SciELO Brasil. E. Fathi et al. 2016
- The Role of Paracrine and Autocrine Signaling in the Early Phase of Adipogenic Differentiation of Adipose-derived Stem Cells. PLoS One. Hemmingsen et al. 2013
- Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Zuk 등. Molecular Biology of the Cells. 2002
- Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. Jeong Chan Ra. Stem cells and Development. 2011
- Impact of Early Subcultures on Stemness, Migration and Angiogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Resistance to In vitro Ischemic Condition. Hossein Faghieh. Cytotechnology. 2017
- Chondroitin Sulphate-based Biomaterializing Surface Hydrogels for Bone Tissue Engineering. Applied Materials & Interfaces. Kim et al. 2017.

Revisiting whitlockite, the second most abundant biomineral in bone: nanocrystal synthesis in physiologically relevant conditions and biocompatibility evaluation. ACS publications. Jang et al. 2013.