

인간 지방유래 줄기세포의 분화능과 측분비 효과의 분석 및 황산콘드로이틴 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

서울대학교 의과대학 의학과 하주민(2015-14848), 분당서울대학교병원 성형외과 허찬영(lionheo@snu.ac.kr)

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 hacks 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 bedsides 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.

Keywords: human adipose derived stem cell, mesenchymal surface marker, adipogenic characteristic marker, osteogenic differentiation, chondrogenic differentiation, paracrine signaling, Chondroitin Sulphate-Whitlockite, Demineralized bone matrix

INTRODUCTION

I -1. Basic Concepts of Stem Cell Science

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

본 연구는 성체 지방 조직에서 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)의 일종인 인간 지방유래 줄기세포를 분리, 배양하려고 시도하였다. 이를 Flowcytometry를 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 인간 지방유래 줄기세포의 증식과 분화능에 대한 연구가 이루어져 다른 공급원의 성체줄기세포보다 줄기세포의 특성이나 분화능이 뒤떨어지지 않음이 보고되고 있다. 뿐만 아니라 과거에는 배아 줄기세포의 특성으로 알려져 있던 다른 배엽으로의 분화, 즉 이행분화(transdifferentiation)도 가능하다고 밝혀졌고 성체줄기세포를 손상 받은 장기에 직접 주입하지 않고 혈관이나 주변 조직에 이식하더라도 손상 장기로 동원되어 손상 부위를 복구한다는 연구들도 보고되고 있다.

이제 인간 지방유래 줄기세포 자체의 증식과 분화에 의한 치료 효과에서 벗어나 줄기세포가 분비하는 물질에 의해 증식과 분화가 이루어지는 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 촉진시키고 사멸을 억제하는 인자는 증가시키고, 반대로 세포의 생존능을 감소시키며 사멸을 일으키는 인자는 소비하려는 성향을 밝혀내려고 주목하였다. 본 연구는 인간 지방유래 줄기세포를 지방 전구세포와 공배양하여 줄기세포가 내는 분비체들이 주변 분비 효과에 의해서 지방 분화를 유도할 수 있는지 확인하고 이를 흡광도와 RT-PCR을 통해 정량적으로 분석하고자 한다.

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

줄기세포의 분화능을 생체 공학과 연동하여 그 효과를 증가시키려는 시도를 해보고자 하였다. 황산 콘드로이틴(Chondroitin Sulphate)는 결합조직 내에서 글리코사미노글라이칸(Glycosaminoglycan)의 주성분인데 칼슘 이온과 마그네슘 이온 등 양이온을 끌어당겨 골형성에 있어 호의적인 환경을 만드는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 칼슘 이온과 마그네슘 이온 등의 양이온과 결합했을 때 신호 전달 경로에도 관여하여 골 재생을 증가시키고 세포 외 기질의 침착과 생체미네랄화를 촉진시킨다.

본 연구는 칼슘 이온과 마그네슘 이온, 인으로 조합된 휘트로카이트(Whitlockite)를 제조하여 이를 X-선 회절을 이용해 정량과 상을 분석하고 황산콘드로이틴을 이용한 하이드로겔(hydrogel) 골충전재를 만들어보고자 하였다. 그리고 이를 촉진시키는 인간 지방유래 줄기세포와 공배양하여 골분화에 있어 돌의 시너지 가능성을 확인하고자 하였다.

MATERIALS & METHODS

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

II-2. Flowcytometry(MSC surface markers)

II-3. Differentiation of hADSC into Chondrocytes and Osteocytes

II-4. Coculture of hADSC on Preadipocyte cell lines

II-5. Safranin Red & Alizarin Red Staining

II-6. Oil Red O Staining

II-7. Real Time PCR(Stemness gene & adipocyte characteristic markers)

II-8. Synthesis of Chondroitin Sulphate-based Whitlockite Demineralized Bone Matrix(DBM)

II-9. Quantative Analysis of DBM: X-Ray Diffraction(XRD)

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

II-10. Live & Dead Staining

RESULTS

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

매일 하루 단위로 40배의 광학현미경을 이용하여 인간 지방유래 줄기세포를 관찰하였다. hADSCs의 특징적인 모양으로 주변으로 줄기처럼 돌기들을 뻗어나가는 별모양(astrocyte-like)의 증식 양상을 보이는 것을 보였다. 10주 간의 관찰 결과 passage가 늘어날 수록 hADSCs로서의 형태학적인 증식이 줄어들고 불규칙적해지며 증식 속도도 현저하게 감소함을 확인하였다.

<Figure 1> Morphologic changes of isolated hADSCs through its passages. The hADSCs cultured on 100/150mm plate with DMEM(10% FBS and 1% penicillin/streptomycin) was observed and captured at 40X

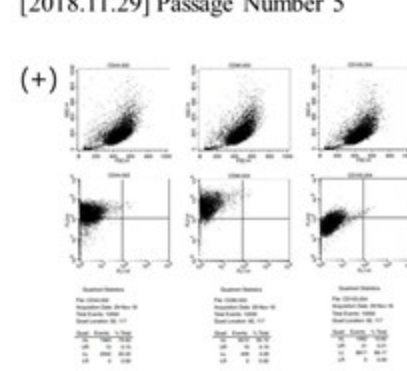
(A) hADSC Isolation & Culture



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

<Figure 2> Confirmation of MSC surface markers: CD19, CD34, CD45, CD90, CD105, HLA-DR via flowcytometry

(A) hADSC FACS



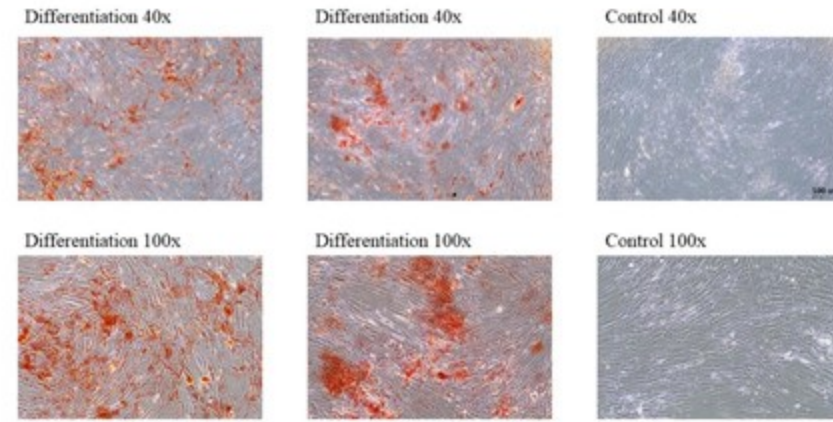
(B)

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%

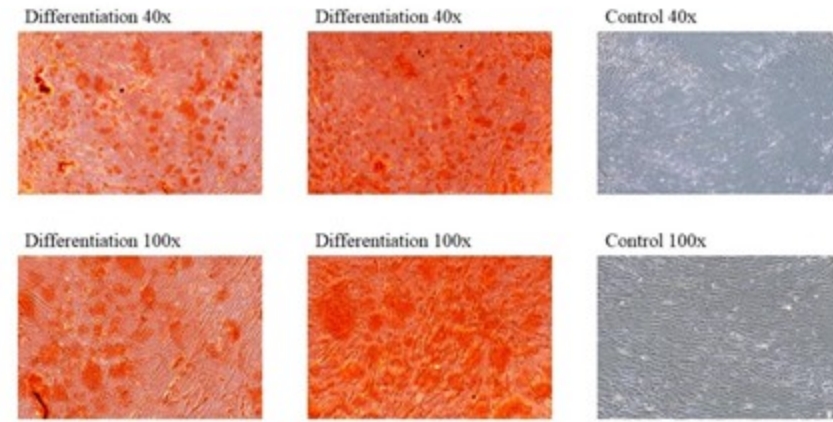
III-3. Chondrogenic & Osteogenic Differentiation of hADSCs

<Figure 3> Confirmation of osteogenesis and chondrogenesis of hADSCs(p7) cultured in their own differentiation media. Followings are optical photographs of control group, experimental group stained in Alizarin Red & Safranin O

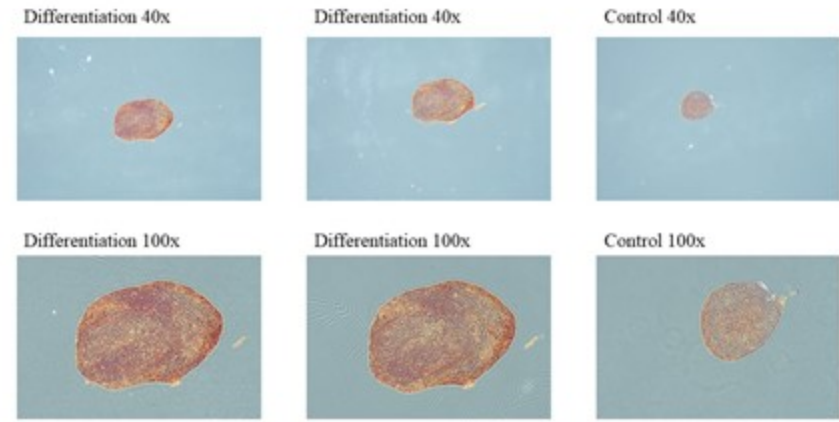
Alizarin Red Staining Week 3



Alizarin Red Staining Week 4



Safranin O Staining Week 3

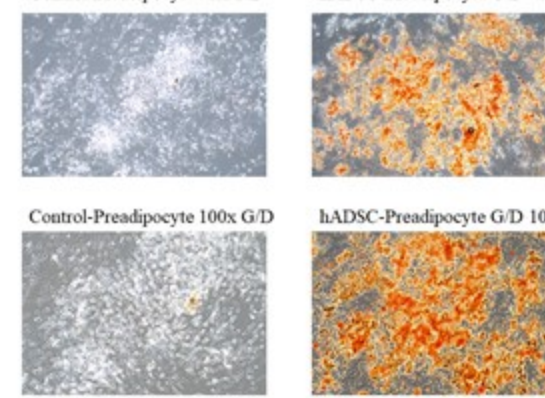


III-4. Adipogenic Differentiation of hADSC by Paracrine Signaling

<Figure 4> Analysis of paracrine signaling of hADSCs: 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.

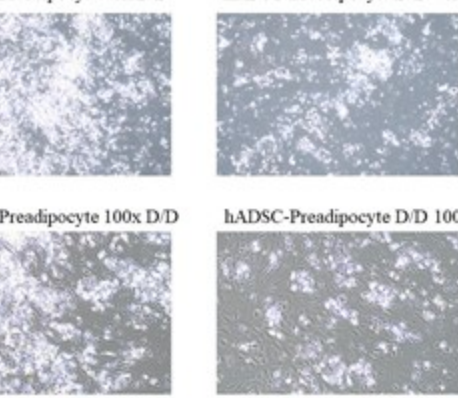
(A)

Oil Red O Staining Week 3



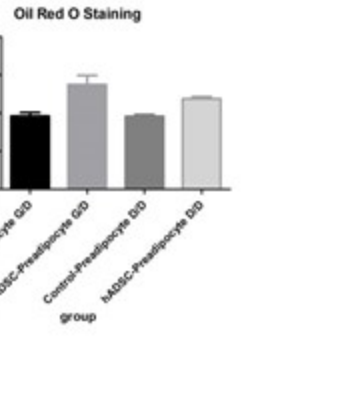
(B)

Oil Red O Staining Week 3



(C)

Oil Red O Absorbance



(D)

Oil Red O Absorbance

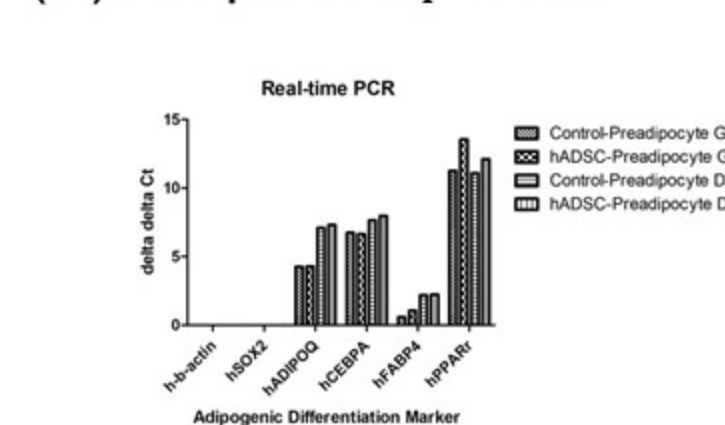
Group	Control Preadipocyte G1D	hADSC Preadipocyte G1D	Control Preadipocyte G2D	hADSC Preadipocyte G2D
Sample	1	2	1	2
OD(550nm)	0.176	0.207	0.151	0.236
OD(550nm) average	0.192	0.237	0.216	0.192

<Figure 5> Analysis of stemness gene(hSOX2) and adipogenic differentiation marker(hADIPOQ, hCEBPA, hFABP4, hPPARγ).

(A) C_T value

Sample Name	Target Name	C_T
Control Preadipocyte G1D	hSOX2	21.881
hADSC Preadipocyte G1D	hSOX2	21.971
Control Preadipocyte G2D	hADIPOQ	21.962
hADSC Preadipocyte G2D	hADIPOQ	22.226

(B) Graph of C_T value



(C) $\Delta\Delta C_T$ value

Group/Gene	h-actin	SOX2	ADIPOQ	CEBPA	FABP4	PPARγ
Control Preadipocyte G1D	0	-	4.297	6.796	6.569	11.224
hADSC Preadipocyte G1D	0	-	4.267	6.634	1.899	13.543
Control Preadipocyte G2D	0	-	7.676	7.625	2.181	11.091
hADSC Preadipocyte G2D	0	-	7.399	7.963	2.226	12.112

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

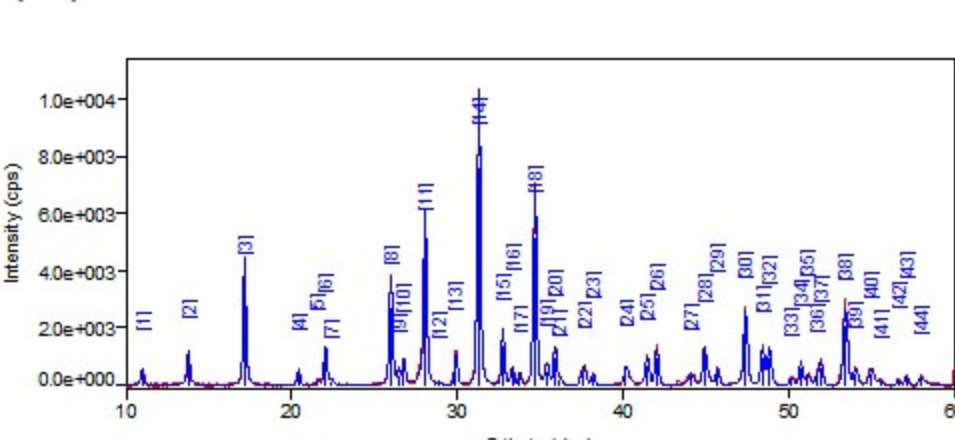
<Figure 6> Quantative and phase analysis of Whitlockite

(A)

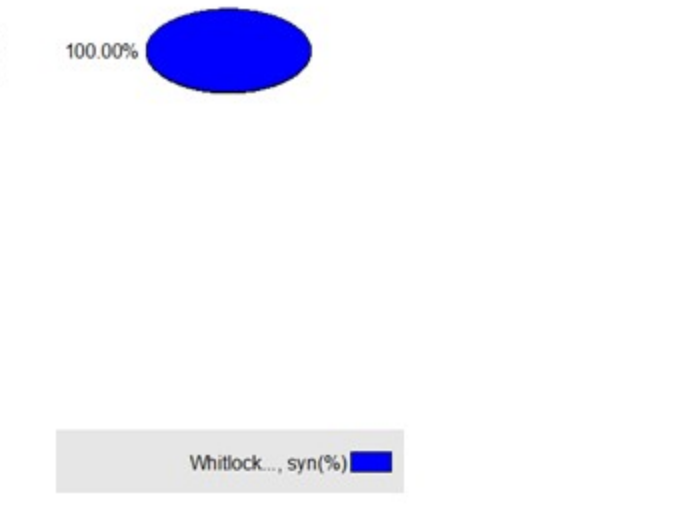
Quantitative Analysis Results (WPPF)

General information			
Analysis date	2018/02/19 14:29:05	Measurement date	2018/02/19 13:44:18
Sample name	WH12_1 raw	Operator	Admiral
File name	-		
Comment	-		
Qualitative analysis results			
Phase name	Formula	Phase (mg. detail)	DB card number
Whitlockite, sp.	Ca13Mg11Si12O44F14	ICSD 1758-2 (Release 2016 RSD)	01-070-2084
Weight ratio			
Phase name	Content(%)		
Whitlockite, sp.	100 (11)		

(B)



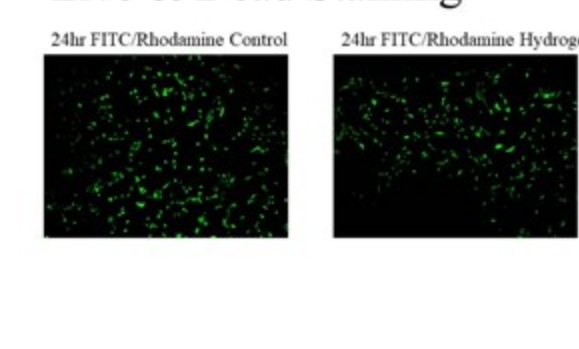
(C)



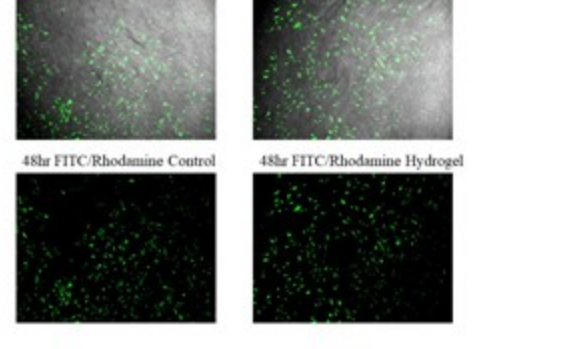
III-6. Cell Viability of hADSC on Chondroitin-Sulphate based Whitlockite

<Figure 7> Live/Dead staining of hADSCs. Control group has only hADSCs, whereas Experimental group has hADSCs with hydrogel cocultured on osteogenic media

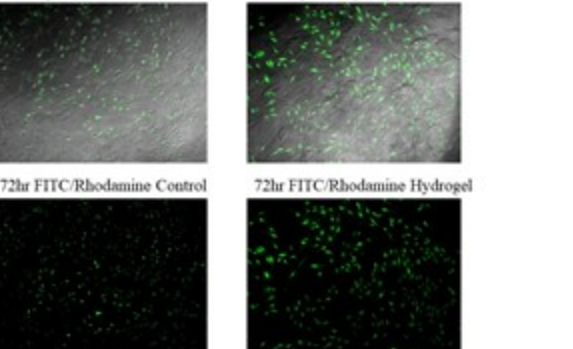
Live & Dead Staining



Live & Dead Staining



Live & Dead Staining



DISCUSSION

인간 지방유래 줄기세포는 기존에 중간엽 줄기세포를 채취하던 골수유래 줄기세포에 비해 세포 수가 풍부하고 공여자의 고통을 동반하지 않는데다 쉽게 접근가능하며 부작용도 적다. 게다가 이론적으로 passage가 25를 넘어도 면역표현형을 유지하면서 증식, 분화할 수 있는 세포 생존능도 갖추었다. 이는 지방유래 줄기세포가 향후 손상된 결손부에 이상적인 줄기세포의 공급처가 될 수 있음을 말하며 이를 활용한 임상에서의 전망은 밝다.

본 연구는 위와 같은 실험을 통해 다음의 줄기세포의 임상적 활용 가능성에 대한 결론을 제시한다. 자가 재생력에 한계가 있는 연골과 골결손부 질환에서 줄기세포의 분화와 증식을 이용하여 주입하는 방식을 할 수도 있으나 확인한 주변 분비 효과를 통해서 줄기세포가 아닌 줄기세포가 분비하는 유효한 특성을 갖는 분비체를 분리하여 치료 효과를 내는 새로운 패러다임도 제시할 수 있을 것이다. 또한 줄기세포의 효과를 증가시킬 수 있는 생체공학에 대한 연구가 진행된다면 임상 현장에서 더 다양한 방법으로 치료를 진행할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 조혜경. 인간 지방조직에서 분리된 줄기세포의 표면항원 및 다분화능 확인. 대한임상검사항학회지. 2008
- 강목규 외. 지방기질 유래 줄기세포의 골 분화 시 성장인자의 효과. Journal of Korean Oral Maxillofacial Surg. 2006
- 이종원. 지방줄기세포의 특성과 임상적 응용. Journal of Korean Med Assoc. 2012
- 박수정 외. 지방조직 유래 중간엽 줄기세포의 세포군별 정리. Journal of Korean Burn Society. 2011
- 정진섭. 지방유래 중간엽줄기세포. The Journal of Korean Society for Transplantation. 2008
- AB Tonchey et al. Adipobiology of Stem Cell Based Therapy: Secretome Insight. Journals mu-vama
- E. Fathi et al. Isolation, Culturing, Characterization and Aging of Adipose Tissue derived Mesenchymal Stem Cells: Brief Overview
- Hemmingsen et al. The Role of Paracrine and Autocrine Signaling in Early Phase of Adipogenic Differentiation of Adipose-derived Stem Cells. PLoS One. 2013
- Zuk. Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells. Molecular Biology of Cells. 2002
- Jeong Cha Ra. Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Huamans. Stem Cell and Development. 2011
- H. Faghhi. Impact of Early Subcultures on Stemness, Migration, Angiogenic Potential of Adipose Tissue derived Stem Cells and Their Resistance to In Vitro Ischemic Condition. Cytothechnology. 2017
- Kim. Chondroitin Sulphate-based Biomimetic Surface Hydrogels for Bone Tissue Engineering. Applied Materials & Interfaces. 2017