

Bioreactor를 이용한 골 조직 공학에 대한 고찰

전재윤, 정주련, 심광섭, 박창주, 황경균

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과학교실

Bone tissue engineering with bioreactors

Jae-Yun Jeon, Joo-Ryun Chung, Kwang-Sub Shim, Chang-Joo Park, Kyung-Gyun Hwang

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Reconstruction and regeneration of segmental defects and the atrophic maxilla and mandible have been performed using various techniques. Traditionally, the concept of guided bone regeneration has required reconstruction with autogenous particulate bone graft. One of the disadvantages of the guided bone regeneration is that it needs additional surgery. Also, it has the limitation of processing allogenic and heterogenic bone, not including bone-forming cells. The investigation of reconstructing defects using tissue-engineering utilizes the convergence of engineering and basic research advances in life science to solve the limitations. For tissue transplantation, bone-forming cells which make up the tissue to be able to form a bone carrier (scaffold), growth of inducing differentiation of a cell (cell), and the bone tissue for creating a bone tissue factor (growth factor) are required. And to require a system that can fuse these factors, it can be regarded as a bioreactor which enables three-dimensional culture system of these. Recently, development in tissue engineering and clinical attempts to deal with bioreactor have been actively proceeding. In this paper we are trying to study on bone tissue engineering around the bioreactor. (JOURNAL OF DENTAL IMPLANT RESEARCH 2014;33(3):63-66)

Key Words: Bone, Tissue engineering, Bioreactor

서 론

재생의학의 한 분야인 조직공학을 이용한 조직 재생의 기본 개념은 인체내의 장기 및 조직을 구성하는 기본 단위인 세포, 담체, 성장인자, 신생혈관 형성을 생명의학적인 방법과 공학적인 기술을 융합하여 결손된 인체 조직의 형태학적 및 기능적인 재생을 유도하고자 하는 것이다^{1,2)}. 최근 조직공학의 연구와 줄기세포에 대한 연구들이 활발하게 진행되어 다양한 분야에서 조직재생 및 재건을 시도하고 있다. 혈관³⁾, 요도⁴⁾, 방광⁵⁾ 등 인체내의 많은 조직들을 인공적으로 재현하고자 하고, 실제 임상에서도 조직공학적 재생방법으로 제조된 인공조직들이 성공적으로 임상에 시도되고 있다. 치의학 영역에서 치조골 재생연구는 임플란트에 대한 학문적 발전과 임상적인 요구에 따른 임플란트를 위한 골이식 수술 및 재료에 관심과 연구가 활발해지면서 진행되기 시작했고⁶⁾, 치조골재생을 위한 조직공학적 접근은

2000년대 초반부터 연구가 시작되었다⁷⁻¹¹⁾. 치조골 재생을 위한 연구는 악골 및 다른 골조직에서 골유사세포 등을 추출하고 이를 다시 이식하는 등의 세포분야에서 많이 진행되었고, 최근 줄기세포의 연구가 활발하기 시작하면서 골수유래 줄기세포 및 치아 관련 성체줄기세포들을 조골세포로 분화시키는 연구들이 진행되어 왔다¹²⁻¹⁶⁾. 조직공학적 골이식 모델의 중요한 부분 중의 하나는 분리되고 배양된 특정 세포를 생체적합성 있는 담체에 위치시키는 3차원 세포배양이다. 현재까지 다양한 세포배양 방법이 시도되고 있는 데, 임상에서 분리가능한 세포수의 확보가 수월하지 않고, 분리된 세포의 증식이나 세포 표현형을 유지하는데 한계를 가지고 있다. 즉, 세포 배양시 세포 증식이나 골 재생에 필요한 조골세포로의 분화에 있어 표준화시키고 대량으로 배양하는데 있어 문제점이 있다. 또한 조직공학적 골이식모델을 임상에서 사용하기 위해서는 단시간에 많은 세포를 담체에서 배양하는 효율성 문제와 단순한 배지와 배양 시스템만을 이

Received November 15, 2014, Revised November 30, 2014, Accepted December 10, 2014.

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 황경균, 133-791, 서울시 성동구 왕십리로 222번지, 한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

Correspondence to: Kyung-Gyun Hwang, Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang University, 222 Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea. Tel: +82-2-2290-8676, Fax: +82-2-2290-8673, E-mail: hkg@hanyang.ac.kr

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (NRF-2013R1A1A2009975).

용하여 배양과정에서의 감염이나 면역적 오염 문제를 해결해야 하므로, 실제 임상에 적용되었을 경우에 이식조직의 안정성에 대한 문제를 극복하여야 한다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 방법으로 다양한 형태의 바이오 리액터(bioreactor)를 개발 중이고, 새로운 안정성을 보장할 수 있는 배지를 지속적으로 혼합하고 세포에 영양분을 수송함으로써 효율이 높은 세포배양 및 필요한 조직으로의 분화를 동시에 기대하고 있다. 이에 본 논문에서는 bioreactor를 중심으로 골 조직공학에 대한 고찰을 해보고자 한다.

Bioreactor 종류 및 특성

1. Spinner flask bioreactor

배지혼합을 통해 이루어지는 간단한 형태의 시스템이다. 구성요소로는 glass media reservoir, stir bar이고 세포배양이 필요한 담체는 실이나 내부의 가운데 부분에 고정할 수 있는 시스템을 만들어서 세포와 같이 배양되고, 세포의 부착이 일어날 수 있게 한다. Glass media reservoir는 담체와 세포의 추가 및 제거와 배지의 교환을 위한 돌기가 있고, 세포배양에 필요한 가스 교환을 허용하는 구멍이 있는 덮개로 구성되어 있다. Spinner flask를 이용하여 배양할 수 있는 세포는 다양한데, 초기의 조골세포를 담체와 동시에 배양하기도 하고, 줄기세포와 조골세포를 분화시킬 수 있는 배지를 동시에 혼합하여 세포배양과 동시에 세포의 분화를 시키는 수도 있다. 이러한 세포배양은 2차원적이고 정적인 세포 배양보다 세포 증식과 분화가 촉진될 수 있다는 보고들이 있다¹⁷⁾. 배지에 작용하는 회전은 하방으로 가라앉고 부착되는 세포를 배지 전체로 퍼뜨리고 이렇게 부양된 세포들이 배지 내에 존재하는 담체에 부착할 수 있는 기회를 높여 3차원 세포배양을 유도할 수 있고, 배지 내에 영양분과 산소를 공급하며 stirring에 의한 전단응력이 조골세포 또는 줄기세포의 분화에 영향을 준다. 하지만, 이러한 형태의 배지에 대한 회전효과는 세포증식 및 분화를 촉진시킬 수도 있지만¹⁸⁾, 해로운 난류와 응력을 만들어 전달되는 부위의 세포 괴사를 야기할 수 있다는 단점이 있을 수 있다는 보고도 있다¹⁸⁾.

2. Rotating wall bioreactor

Fluid force bioactivator이며 가스교환이 되는 고정된 내부 실린더와 회전되는 외부 실린더 사이 공간에 배양액 및 세포를 함유한 scaffold가 위치하면서 자유롭게 움직이는 구조로 되어있다. Flask 바이오리액터의 경우는 담체는 시스템에 의해서 고정되어 있고, 배지가 stir에 의해서 회전운동을 하고, 배지 내에 세포가 담체에 부착되어 세포증식과 분화를 촉진하지만, 회전형 바이오 리액터는 세포와 담체가 배지 내에서 자유로이 움직임으로 해서 미세한 중력과 같은 환경을 유도하고, 회전 원동에 의해서 발생하는 원심력에 의해 생기는 유체 흐름 등이 힘의 균형을 이룬다. 이런 환경에서는 배지 내에 세포와 담체는 회전운동에 의한 자유낙하운동을 하게 되는데,

이는 낮은 전단응력과 배지 내에서 빠른 물질이동을 유도하는 역동적인 배양환경을 제공한다. 하지만 이러한 형태의 운동은 담체와 배양 시스템 내부 벽과의 충돌은 담체에 손상을 줄 수 있어 강도가 약한 담체는 사용하는 데 제한이 있다. 여러가지의 형태의 폴리머들을 이러한 형태에서 3차원 세포 배양을 시행할 수 있으며, 조골세포와 담체의 배양과정에서 세포증식과 조골세포로의 분화와 줄기세포의 증식과 분화를 동시에 시행한 결과들도 보고되고 있다^{19,20)}. Song 등¹⁹⁾은 정지된 상태나 spinner flask보다 콜라겐 증가 및 골양조직의 증가를 관찰하였다고 보고하고 있고, Granet 등²⁰⁾은 rotating wall bioactivator를 이용한 실험에서 osteoblast 유사 세포들의 증식 및 분화를 관찰하였고 향후, bone tissue engineering에 적용 가능성이 높다고 보고하였다. 회전 바이오 리액터는 간단한 시스템에 비해서 세포증식과 분화에 효율성을 보이지만, 골화세포 분화에 있어서는 perfusion system보다 떨어진다는 보고가 많다²¹⁾. 일부 보고에서는 담체가 회전 바이오 리액터내의 움직임을 제한하여 조골세포의 배양 및 증식에는 효과가 없었다고 하였다¹⁷⁾. 이에 대한 검증과 배양의 효율성을 증가시키는 연구개발이 필요할 것으로 판단된다.

3. 관류성 바이오 리액터

조직공학적 골재생에 있어서 담체 내부로의 세포 및 신생혈관의 침투는 매우 중요한 요소로이런 세포침투를 할 수 있는 담체형태의 개발과 3차원 배양시스템의 개발은 향후 조직공학적 골재생 모델에 있어 필수적인 개발 및 연구과제로 판단된다. 관류성 바이오 리액터는 앞에서 살펴본 두 바이오 리액터와는 달리, 담체 내부로 배지가 Scaffold에 효과적으로 침투되고 내부에 부착된 세포의 증식과 분화를 야기하기 위해 개발된 시스템이다. 이는 플라스크 외부에 장착된 펌프시스템을 이용하여 배양액을 직접 관류시키며, 관류되는 배양액이 담체를 통과하는 형태의 3차원배양 시스템이다. 구성요소로는 pump, tubing circuit, media reservoir, perfusion cartridge 이 있다. Scaffold는 perfusion cartridge를 갖고 있고 배양액이 scaffold 구멍을 통해 흐르도록 하고 scaffold주위로 흐르지 못하게 봉쇄되어 있다. 이처럼 perfusion cartridge가 scaffold에 맞게 제작되어야 하고, scaffold 또한 interconnected pore가 되어야 하기 때문에 제작이 어렵지만 그 효율성 때문에 지속적인 연구가 진행되고 있다. Cartmel 등²²⁾은 관류성 바이오 리액터에서 발생하는 0.01~2 ml/min의 다양한 유속이 세포의 생존과 활성화에 영향이 있다고 보고하였다. 그는 유체 흐름이 세포의 증식과 분화하게 하고 조골세포가 골관련 물질을 생성하여 골재생에 관여할 것이라고 보고하고 있다. Datta 등²³⁾은 fluid에 의해 유도된 전단응력이 골화세포 분화를 상당히 촉진한다고 보고하였다. 이러한 관류성 바이오 리액터에서는 담체의 내부로의 세포의 부착 및 증식이 균일하게 일어나고, 세포 분화가 촉진될 것이라는 것이 여러 논문에 의해서 보고되고 있다^{24,25)}. 향후, 임상적용을 위해서는 biodegradable scaffold가

사용되어야 하고 scaffold내의 다공성의 적정비율에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한, 유속의 속도 또한 세포의 분화 및 증식을 촉진시킬 수 있는 기준치를 제시할 수 있어야 할 것으로 보인다.

4. Magnetic force bioreactor

적절한 전자기장이나 전기자극이 세포의 증식과 조직재생에 영향을 준다는 기존 논문들이 있는데^{26,27}, 이러한 자성을 이용하여 세포막에 힘을 적용하는 것이 바이오 리액터 시스템이다. 이는 분해가능한 scaffold에 뿌려진 cell에 자성물질이 세포막의 이온채널에 직접적으로 부착함을 이용하는 것이다. 이는 힘이 직접적으로 세포막에 가해지므로 scaffold의 rigidity가 필요치 않고 입자들이 자성배열에 의해 짝을 짓기 때문에 직접 접촉에 의한 감염 가능성이 줄어드는 장점이 있다.

5. Mechanical loading device

골 조직은 기계적 하중, 인장력, 압축력, 구부림, 전단력 등 다양한 형태의 힘을 받는 구조이다. 실험상의 장치는 이러한 기계적 자극이 골 대사에 영향을 미친다는 가정 하에 고안된 장치이다. Piston compression system, substrate bending, hydrodynamic compression, fluid shear 등의 다양한 물리적 자극을 구조물에 적용시키고 있다. 이런 기계적 자극을 지지할 수 있는 soft한 scaffold (hydrogel, polymer, collagen)의 사용이 요구된다. Ignatius 등²⁸은 cyclic loading 하에서 정지 상태에 비해 골화세포 증식 및 발현이 증가됨을 확인하였다.

Bioreactor의 발전방향

역동적인 운동과 흐름을 유발하는 바이오리액터를 통해 세포의 증식 및 분화를 촉진하여, 세포의 배양이 담체의 일부 주변에 제한되지 않고, 담체 내부에 균등하게 분포되고 성장 또한 증식되게 하기 위한 시스템이 개발 연구되고 있지만, 향후 임상적으로 사용가능하기 위해서는 기술의 발전 및 개발이 필요할 것으로 보인다. 우선, 3차원 배양 시스템의 자동화 및 최적화가 진행되어야 하고, 효과적으로 세포의 증식과 분화를 유발할 수 있는 효용성도 높여야한다. 그리고 세포배양을 위해서 사용되는 동종 혈청이 사용되지 않은 무혈청 배양시스템으로 개발이 되어야 세포-담체 복합체가 인체내에 이식되었을 때의 임상적 안정성을 보장할 수 있다. 최근 골재생과 관련된 단백질이나 성장인자를 동시에 사용할 수 있는 시스템의 개발도 이루어져야 할 것으로 보인다.

References

- Dee KC, Bizios R. Mini-review: Proactive biomaterials and bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 1996;50(4):438-42.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110):920-6.
- Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, et al. Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129(6):1330-8.
- El-Kassaby AW, Retik AB, Yoo JJ, Atala A. Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *J Urol* 2003;169(1):170-3; discussion 73.
- Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006;367(9518):1241-6.
- Ueda M, Tohnai I, Nakai H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artif Organs* 2001;25(3):164-71.
- Xiao Y, Qian H, Young WG, Bartold PM. Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue Eng* 2003;9(6):1167-77.
- Earthman JC, Sheets CG, Paquette JM, et al. Tissue engineering in dentistry. *Clin Plast Surg* 2003;30(4):621-39.
- Young CS, Abukawa H, Asrican R, et al. Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng* 2005;11(9-10):1599-610.
- Buckley MJ, Agarwal S, Gassner R. Tissue engineering and dentistry. *Clin Plast Surg* 1999;26(4):657-62, x.
- Dard M, Sewing A, Meyer J, et al. Tools for tissue engineering of mineralized oral structures. *Clin Oral Investig* 2000; 4(2):126-9.
- Yamada Y, Nakamura S, Ito K, et al. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Eng Part A* 2010;16(6): 1891-900.
- Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater* 2008;16:1-9.
- Ma T. Mesenchymal stem cells: From bench to bedside. *World J Stem Cells* 2010;2(2):13-7.
- Schmelzeisen R, Schimming R, Sittering M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation-a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2003;31(1):34-9.
- Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(5):589-97.
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res* 2002;62(1):136-48.
- Di Benedetto P. A new scaffold enriched of mesenchymal stem cells for the treatment of bone defects. 2013.
- Song K, Liu T, Cui Z, Li X, Ma X. Three-dimensional fabrication of engineered bone with human bio-derived bone scaffolds in a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res A* 2008;86(2):323-32.
- Granet C, Laroche N, Vico L, Alexandre C, Lafage-Proust MH. Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions. *Med Biol Eng Comput* 1998;36(4):513-9.

21. Yeatts AB, Fisher JP. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 2011;48(2):171-81.
22. Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ, Guldberg RE. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Eng* 2003;9(6):1197-203.
23. Datta N, Pham QP, Sharma U, et al. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2488-93.
24. Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den Dolder J, et al. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):12600-5.
25. Janssen FW, Oostra J, Oorschot A, van Blitterswijk CA. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 2006;27(3):315-23.
26. Dobson J, Cartmell SH, Keramane A, El Haj AJ. Principles and design of a novel magnetic force mechanical conditioning bioreactor for tissue engineering, stem cell conditioning, and dynamic in vitro screening. *IEEE Trans Nanobioscience* 2006;5(3):173-7.
27. Cartmell SH, Dobson J, Verschueren SB, El Haj AJ. Development of magnetic particle techniques for long-term culture of bone cells with intermittent mechanical activation. *IEEE Trans Nanobioscience* 2002;1(2):92-7.
28. Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* 2005;26(3):311-8.