

조직공학과 인공골/피부 재생

서 활

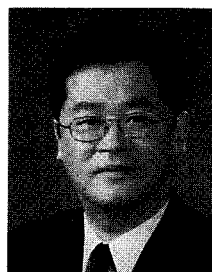
1. 서 론

조직공학은 1987년 미국과학재단(National Science Foundation) 주최로 금속, 세라믹, 합성고분자 등 기존의 무생물재료가 지닌 한계를 극복하기 위해 사람의 세포와 조직을 재구성하여 생기능(biofunction)을 지닌 인공조직을 제작하기 위한 재료의 개발가능성에 대한 워크샵이 개최된 후, 다음 해에 생체재료를 중심으로 의학, 생물학 분야의 전문가들이 모여 미국 캘리포니아 샌디에고에서 최초로 “조직공학”이라는 용어를 사용한 학술모임이 열리게 되었으며, 1995년에는 최초의 전문학술지 “Tissue Engineering”이 발간되기 시작한 최첨단 의료공학기술이다.¹

사람의 몸은 모든 외부환경에 대하여 일정한 한계까지는 자신의 정상적인 생리적 환경을 유지하려는 기능을 가지고 있으며 이를 흔히 항상성이라고 부른다. 면역계(immune system)는 항상성을 유지하기 위해 그 기능을 발휘하는 대표적인 것으로 인체가 질병이나 외상에 의해 항상성유지에 장애가 생기면 정상적인 상태로 회복시키기 위하여 활성화되기 시작하며, 그 가운데 하나의 현상으로서 손상된 조직 세포를 탐식(phagocytosis)하여 제거하면서 재생 정상세포(regenerated normal cell)로 치환시키는 현상이 나타나게 된다.² 가벼운 조직세포의 장애는 자연 치유가 되지만, 약물요법(medication therapy)이나 물리요법(physical therapy)과 같이 적극적으로 손상조직의 정상조직세포화를 위한 방법을 사용하게 되며, 이와 같은 방법으로도 회복시킬 수

없는 경우에는 남아 있는 정상적인 건강조직에 손상이 확산되지 않도록 부득이 이식기능을 하고 있는 손상조직을 제거하는 것이 전통적인 외과의 기본개념이다. 그러나 현대의 외과에서는 손상된 조직의 절제라는 수동적인 방법뿐만 아니라, 제거된 조직의 생리적 기능을 재생시키거나 조직 자체를 유사기능을 하는 물질로 치환하기 위해 많은 노력을 하여 왔으며, 현재는 주로 금속이나 세라믹 또는 합성고분자를 이용하여 조직 대체물을 고안하여 왔으며 실제로 임상에서도 사용하고 있다.³ 그러나 이들 재료는 생물학적 기능을 가지고 있지 못하기 때문에 그 이용에 한계가 있을 수 밖에 없으며, 그 결과 생화학적 기능을 제공하기 위해 인공적으로 조직의 세포를 재구성하여 손상된 부위에 이식하므로써 정상적인 생체의 기능을 조직으로 치환시키기 위한 연구가 시작되었다.⁴

같은 종(species)으로부터 조직을 얻어 이식하는 동종이식은 그 대표적인 조직치환방법이지만 제공자



서 활

1971 연세대학교 치과대학(학사)
~1978
1982~ 연세대학교 대학원(석사)
1984
1985~ Columbia Institute of Materials Science and Technology 연구원
1987
1988~ Osaka대학(박사)
1992
1992~ 서울대학교 의공학연구소
1995 특별연구원
1995~ 연세대학교 의과대학 부교수
현재

Tissue Engineering and Regeneration of Bone and Skin

연세대학교 의과대학 의공학학교실(Hwal Suh, Department of Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-ku, Seoul 120-752, Korea)

를 얻기가 어렵고, 언더라도 이식 후에도 유전자가 다르기 때문에 발생하는 면역성 거부반응을 피하기 위해 면역억제제를 계속 투여하여야 하는 문제가 남아있을 뿐만 아니라 간염이나 후천성면역결핍증(AIDS)과 같은 완벽한 조기진단방법이 없는 바이러스성 감염에 노출된 장기를 이용할 위험을 가지고 있다.⁵ 이에 따라 제거된 조직을 최근에 급격하게 발전한 배양세포학, 분자생물학, 단백질공학, 생명공학 등 첨단기술을 이용하여 인공적으로 생리기능을 할 수 있도록 배양한 세포로 조직을 재구성한 인공장기를 제작하려는 연구가 활발하게 진행되기 시작하였으며 이를 조직공학이라 부르고 있다.¹

한편 적당한 제공자를 얻기 어려운 현실을 대신하기 위해 동물에 환자의 유전자를 이식하여 복제된 동물장기조직을 이용하려는 연구가 진행되고 있기도 하다. 1997년 3월 스코트랜드의 로슬린연구소에서는 생명공학기술을 이용하여 성숙한 조직세포로부터 DNA를 분리한 다음 똑같은 DNA를 지닌 양을 복제하여 탄생시키므로써 인간복제 가능성에 대한 윤리적인 문제가 격렬하게 일어났으며, 그 결과 인간의 유전자를 지닌 돼지를 만들어내어 돼지장기의 이용에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나 근본적으로 인간의 세포수명은 120년인데 반하여 돼지세포의 수명은 15년에 불과하기 때문에 이를 극복해야 하는 문제가 있다.⁶

본고에서는 조직공학의 기본 개념과 함께 골, 피부 조직 등의 재생을 위한 이용방법을 고찰하고자 한다.

2. 인체조직의 구조

사람의 조직은 크게 나누어 세포, 세포주위의 세포외기질(ECM: extracellular matrix), 그리고 이온성 체액(ionic body fluid)으로 구성되어 있다.

세포는 생명활동의 단위개체로서 핵산으로 구성된 유전자를 포함하고 있는 핵을 포함하여 대사(metabolism)에 필요한 여러 가지 소기관으로 구성되어 있으며, 세포를 외부 환경으로부터 보호 격리하는 인체의 세포막은 소수성으로서 인지질로 이루어진 막이 2개 층을 이루고 있으며 콜레스테롤을 포함하고 있고, 막의 표면에는 탄수화물들이 단백질과 결합한 당단백이나 지질과 결합한 당지질의 형태로 존재하고 있다. 세포막에 존재하는 인지질은 phosphoglyceride로서 glycerol이 가진 3개의 수산기 가운

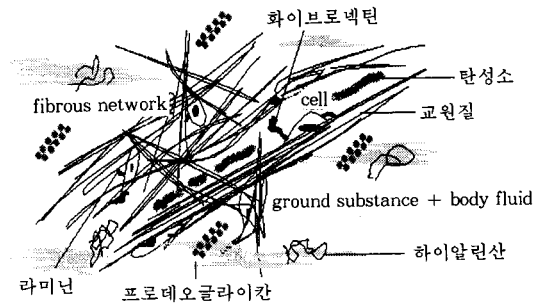


그림 1. 조직 구성의 모식도. 이온성 용액인 체액속에 섬유성 단백질인 교원질이 형성하는 구조체와 당, 무기질 등으로 이루어진 세포외기질에 세포가 정착되어 조직을 형성한다.

데 하나가 인산과 에스테르 결합을 하고 있기 때문에, 인지질분자의 한쪽은 극성을 가지고 다른 한쪽은 비극성인 amphiphilic 분자이다. 세포막을 이루는 인지질 2층구조는 (-)전하를 가진 phosphate가 세포내/외액(intra/extracellular fluid)을 향하고 있으며, 비극성쪽은 막의 가운데로 향하고 있다.⁷

세포는 조직의 형태를 구성하는 세포외기질에 정착되어 있고, 세포외기질이 제공하는 생물학적 환경에 의해 생존한다. 세포외기질은 세포자신으로부터 합성, 분비된 단백질을 주성분으로 다당류를 포함한 유/무기질을 함유하고 있다(그림 1). 특히 단백질 가운데 교원질(collagen)은 섬유상으로 존재하면서 구조체(structural component)를 형성하여 조직의 형태(morphology)를 유지시키며, 세포들은 교원질과 직접 또는 접착성 당단백질을 매개로 다른 기질들과 접착한 상태에서 생명력을 나타낸다. 지금까지 널리 알려진 접착성 당단백질로는 섬유결합소(fibronectin), 라미닌(laminin), 비트로넥틴(vitronectin) 등이 있으며, 이들 펩타이드 모두와 교원질에는 공통적으로 아르지닌-글라이신-아스파르산(RGD)서열이 자리하고 있다.⁸

RGD서열은 비면역성 펩타이드로서 세포막에 존재하는 수용체에 의해 인지되어 결합하며, 이들 결합성 수용체는 특별히 인테그린(integrin)이라고 한다. 즉 세포막상에 존재한 인테그린이 세포외기질상에 존재하는 배위자(ligand)를 인식하면 결합하며, 인테그린은 세포마다 구성하는 조직에 따라 다르고, 이들은 RGD뿐만 아니라 세포외기질의 주성분인 교원질도 인식하여 결합한다(그림 2).⁹

한편 세포외기질에는 세포의 분열, 증식을 조절하는 세포조절물질(cytokine)이 존재하며, 이들은 대

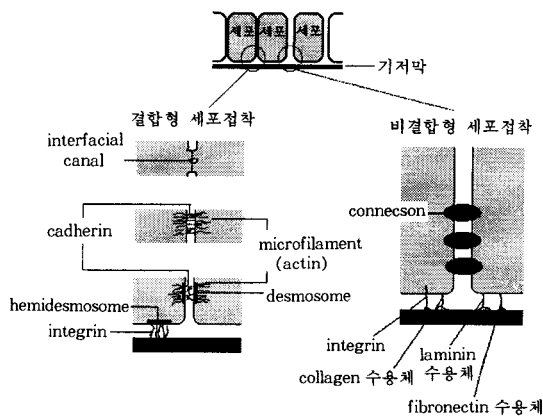


그림 2. 세포막과 세포외기질의 결합. 세포막에 존재하는 인테그린이 접착성 당단백을 중계로 세포외기질과 접착하거나, 세포외기질의 주성분인 섬유성 교원질과 직접 결합한다.

개 약 25-100 kDa 정도 크기의 펩타이드로서 모든 세포의 원형세포인 간세포(stem cell)가 최종 분화산물인 조직세포로 분화되고 변형되어 증식하기까지 각각의 단계에서 이를 촉진 또는 억제하는 역할을 하는 등 조직세포의 발생, 재생에 매우 중요한 역할을 한다.¹⁰

3. 조직공학의 특성

기존에 사용되어 오던 금속이나 세라믹과 같은 무기질로 이루어진 의료용 생체재료는 본래 세포외기질이 담당하는 구조체의 역할에 그치고 있으며, 세포의 생존에 필요한 생리적 활성기능을 부여할 수가 없다. 따라서 필요한 조직의 세포외기질을 인공적으로 추출하거나 직접 처리한 다음, 이들이 제공하는 자연상태의 세포생물학적 환경에서 세포를 배양, 조직을 재구성하는 것이 조직공학의 기본 기술이다.¹¹

조직 구성분 가운데 인공적으로 합성할 수 있는 것은 극히 제한적이므로 조직공학에 사용되는 재료는 세포를 포함하여 천연조직 성분을 이용하는 것이 대부분이다. 인공조직제작의 일반적인 순서는 우선 해당 조직에 대해 생체친화성을 가진 재료를 이용하여 조직의 형태를 모방한 구조체(scaffold)를 만든 다음, 세포의 분화, 접착, 증식에 알맞도록 세포외기질을 직/간접적으로 제공하고, 조직세포가 자라도록 하는 방법을 사용하고 있다.¹²

구조체의 경우, 천연조직의 구조단백질인 교원질

을 비면역화 처리하여 그 자체를 이용하기도 하지만 혈관, 건(tendon), 관절연골(joint cartilage) 등과 같이 생리적 부하를 받는 조직을 재생하고자 할 때에는 교원질 자체만으로는 적당한 생체역학적 성질을 제공하기가 어려우므로, 합성고분자의 표면에 교원질을 공중합하여 세포외기질이 가진 생물학적 환경을 제공할 수 있도록 모방하여 이용하고 있다.¹³ 특히 생명공학의 발달에 따라 펩타이드의 합성 및 대량 생산이 가능해진 요즘에는 고분자의 표면에 각종 펩타이드를 graft하여 세포와 직접 결합하도록 유도함으로써 생리적 활성기능이 부가되도록 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 세포외기질에 포함된 접착성 당단백질은 세포가 기질에 접착하도록 하는 역할을 하므로 인공적으로 구성하려고 하는 조직의 세포가 지니고 있는 인테그린에 대응하는 배위자를 생체재료의 표면에 제공하면, 주위의 세포가 재료표면에 직접 결합할 수 있도록 유도할 수 있으므로 고분자로 제작한 구조체의 표면에 이들 당단백질을 도입한 다음 체외환경(*in vitro*)에서 조직세포를 직접 접착 배양하거나, 체내환경(*in vivo*)에서는 세포가 재생 과정에서 정착할 수 있도록 고분자와 세포로 구성된 인공 복합조직(hybrid tissue)을 제조할 수 있다 (그림 3).¹⁴

4. 교원질(Collagen)

세포외기질 가운데 교원질은 모든 포유동물에서 세포가 지지되고 증식되어 조직의 구조를 형성하는 섬유성 단백질로서, 이미 각종 생체재료로써 널리 이용되고 있다. 손상조직 수복의 가장 이상적인 형태가 자가(host)조직의 재생만으로 완전하게 이루어지는 것이라고 볼 때, 손상된 부위에 적당한 양의 세포외기질을 제공하므로써 치유 과정에서 형성되는 섬유성 교원질형성까지 요구되는 시간을 단축시키고, 자가세포의 침윤을 촉진하므로써 인공적으로 재구성하여 투여한 교원질이 자가조직의 구조체역할을 할 수 있기 때문이다.¹⁵

현재까지 약 18개의 교원질의 종류가 밝혀졌으며, 그 가운데 인체에 가장 풍부하게 분포하고 있는 것은 I형 교원질로서, 3개의 글라이신(G)-X-Y의 펩타이드 서열이 반복되는 분자량 약 100,000의 좌선형 α -쇄(α -chain)가 서로 분자내 가교를 이루면서 다시 우선형 나선(helix)의 섬유상 분자 형태를 이

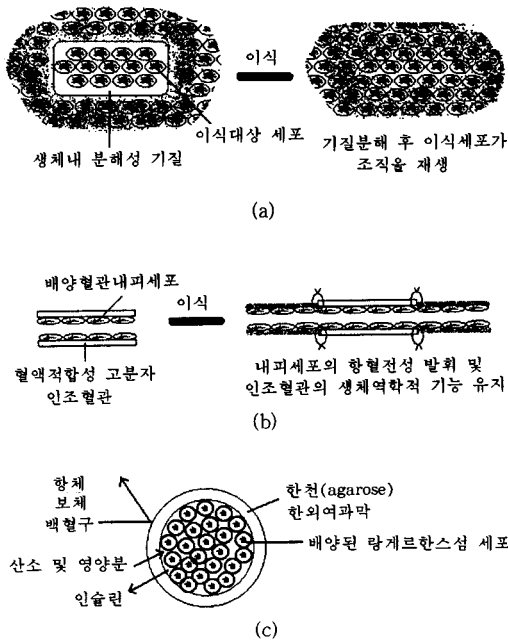


그림 3. 고분자-세포 복합체의 개념도. (a) 생분해성 고분자 구조체와 세포 복합체를 이식하여 고분자 구조체는 체내에서 분해되고 이식세포가 조직을 치환시키거나, (b) 강한 생체역학적인 물성을 요구하는 경우에는 비흡수성 고분자의 표면에 조직세포를 접착하여 생물학적 기능을 부여하기도 하며, (c) 생화학적 기능을 요구하는 조직세포는 고분자로 포매하여 항원-항체반응은 차단하고 세포로부터 생성되는 생리활성물질의 분비는 이루어지도록 처리하는 방법을 이용한다.

루는 특이한 분자구조를 가지고 있다. 하나의 α -쇄는 각각 나선형성부위가 1,012개 나선을 형성하고 남은 양 말단이 각각 12개 및 27개의 아미노산으로 구성되어 있고, 이들 양 말단은 다른 분자와 서로 결합하여 다시 교원질 미세섬유를 형성하고 있으며, 나선을 형성하지 않는 말단 부위의 펩타이드를 특히 아텔로펩타이드(atelopeptide)라고 부른다.¹⁶ 생체재료는 체내이식후 면역반응이 없어야 하고, I형 교원질의 경우 바로 아텔로펩타이드 부위의 아미노산들이 개체를 인식하고 면역반응을 일으키므로 펩신(pepsin)을 이용하여 아텔로펩타이드를 제거하여 사용하며 이렇게 제거된 상태의 교원질을 아텔로교원질(atelocollagen)이라고 부른다. 아텔로교원질로 만들면 분자간 결합이 파괴되어 분산되어 그 자체를 주사용(injection)으로 사용하기도 하지만, 구조체를 만들기 위해서는 이들 분자를 다시 결합시켜야 하므로 인공적인 분자간 가교를 일으켜 주며 각각 화학적

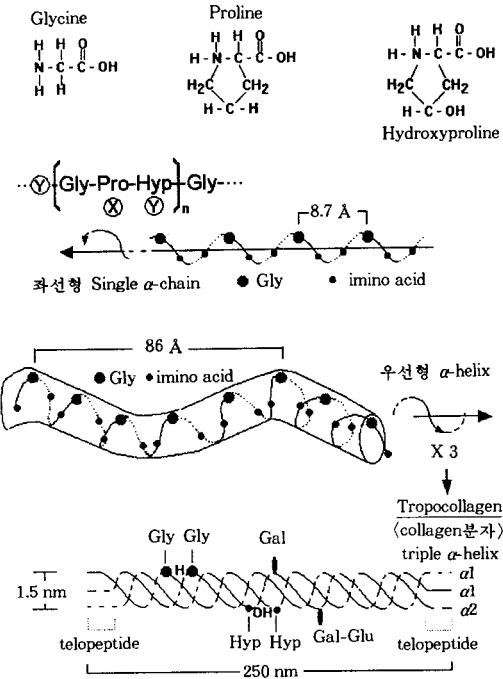
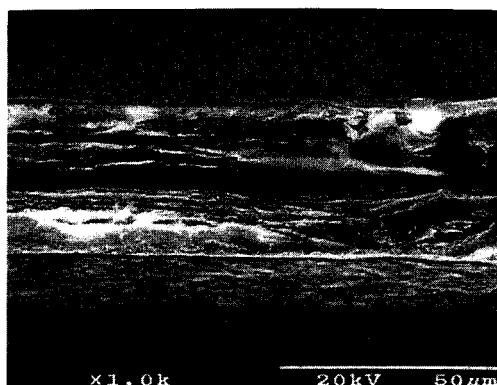


그림 4. 교원질 분자의 형태. 3개의 우선형 α -쇄가 다시 좌선형구조를 이루면서 결합하여 하나의 I형 교원질 분자를 형성한다.

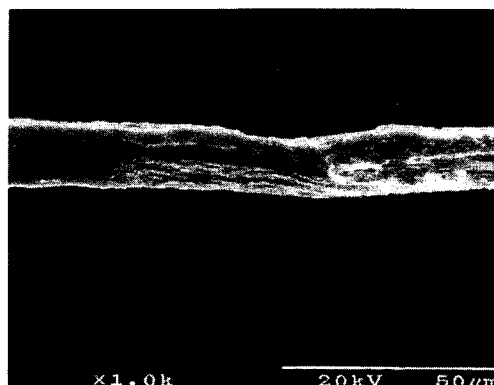
인 방법 또는 물리적인 방법을 이용한다(그림 4).¹⁷

화학적인 방법으로는 글루탈알데하이드(glutaraldehyde: GA)를 비롯하여 아이소시아네이트(hexamethylenediisocyanate: HMDIC), 에폭시 등을 이용하여 펩타이드에 존재하는 아민기(amine to amine)결합을 유도, 가교화시키는 방법이 사용되고 있으나, 가교화 반응후 남은 잔류 알데하이드기에 의한 독성 발현과 가교교원질의 빠른 석회화 등의 문제가 해결되고 있지 않다.¹⁸ 이에 비해 감마(γ)선이나 자외선(UV)과 같은 광에너지를 이용하여 펩타이드내의 아민-카복실 결합을 유도하여 기교화하는 방법이 활용되고 있으며, 화학물질을 사용하지 않기 때문에 독성과 같은 반응은 일어나지 않지만 교원질 처리과정에서 심부(deep portion)까지 도달하지 않기 때문에 화학적 방법에 비해 상대적으로 물성이 낮은 문제가 남아있다(그림 5).¹⁹

한편 교원질의 측쇄(side chain)를 화학적으로 처리함으로써 교원질의 전하상태를 변화시켜 용해 정도, 혈액과의 반응, 세포와의 작용 및 친수-친지균형(hydrophilicity-lipophilicity balance: HLB) 등을 조절하기도 한다. 교원질의 아미노기를 호박산



(a)



(b)

그림 5. 교원질의 가교방법에 따른 변화. (a) 비가교화 아테로교원질 건조막에 비하여 (b) 자외선 조사후 견고한 교원질 막을 얻을 수 있다.

(succinyl: $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$)화하면 (-)전하가 풍부한 교원질이 되어 중성 pH영역에서도 가용성 교원질이 된다. 보통의 교원질은 중성에서 섬유재생이 일어나 침전을 일으키기 때문에 생리적 조건에서는 투명한 용액을 얻을 수 없다. 또한 호박산화한 교원질의 표면은 혈소판점착 및 응집반응을 억제하는 항혈전성 표면효과도 나타낸다. 한편, 교원질의 카르복실기에 에탄올을 반응시켜 에스테르화하면 (+)전하가 풍부한 교원질이 되면서 역시 중성 pH영역에서의 가용성이 증가함과 동시에 혈소판점착 및 응집이 잘 되는 고혈전성 표면이 되며, 탄화수소를 bleaching하면 교원질의 소수성이 증가하여 계면활성 효과를 부여할 수도 있다. 이와 같이 교원질분자 측쇄의 화학적 수식은 천연교원질이 가진 성질 외에 이용목적에 따라 필요한 추가기능을 부여하는 데 매우 효과적인 방법이다. 인공혈관 표면은 호박산화, 지혈제는 에스테르화 하므로써 더욱 이용가치가 높아진다(그림 6).²⁰

5. 세포의 배양

교원질을 비면역화 처리하고 다시 가교화하여 구조체를 만들고 나면 원하는 세포를 교원질에 잘 부착시키면서 배양해야만 원하는 조직을 인공적으로 제작할 수 있다.

조직수복(tissue restoration)에 세포를 이용하기 위해서는 우선 필요한 세포를 획득하는 것이 우선되어야 한다. 일반적으로 건강한 자가세포를 이용하는

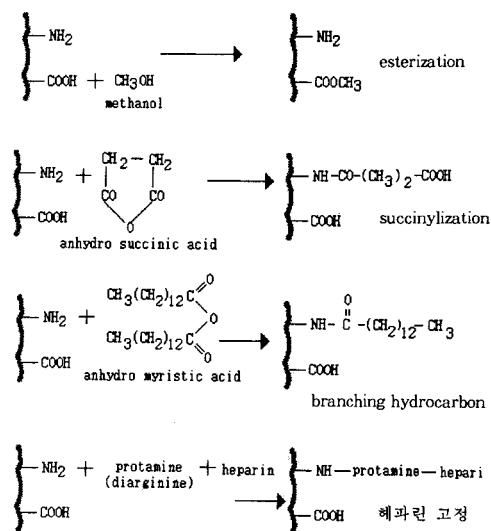


그림 6. 교원질 측쇄를 수식하는 방법의 예.

것이 면역학적으로 가장 안전하지만, 수복해야 하는 조직이나 장기가 완전히 손실되었을 경우에는 타인으로부터 얻어 배양을 하여 이식하는 것이 시도되고 있다. 현재 인공적인 배양이 가능한 세포는 매우 광범위하여 조직구조세포는 물론 췌장의 랑거한스섬세포(Langerhan's islet cell)와 같은 기능성세포까지도 배양이 가능하다. 배양은 세포생장에 필요한 생체내의 조건을 체외에서 인공적으로 제공하여 세포를 대량 증식시키기 위해 흔히 사용하는 기술이다. 조직절편을 인공적으로 증식시켜 본래기관의 조직구조를 유지하면서 재현시키는 것을 조직배양이라고 하고, 특정한 세포만 분리하여 배양하는 것을 세포배

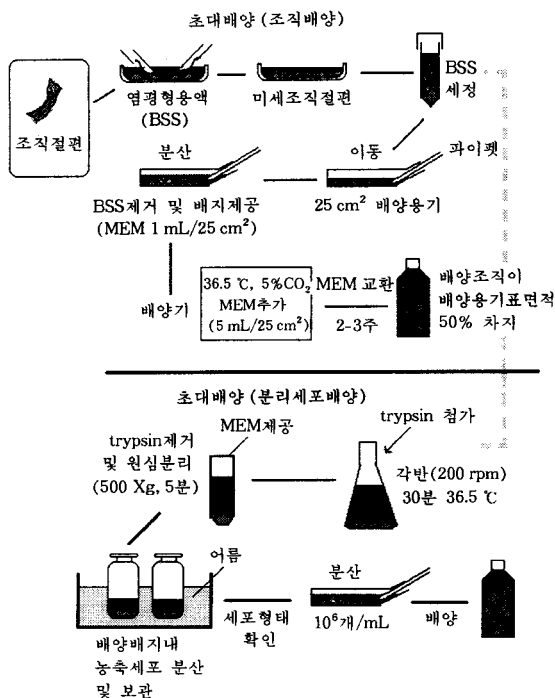


그림 7. 조직 및 세포배양의 기본방법.

양라고 한다(그림 7).²¹

체외에서 유사조직구조를 재생하기 위해서는 서로 다른 세포를 배양하여 재집합시키거나, 다세포 구상체(multicellular spheroid)와 같은 고농도의 세포를 배양하는 방법, 세라믹이나 합성고분자 표면에 세포를 다층으로 배양하거나, 조직의 구조체인 교원 섬유상에서 배양하는 방법 등이 시도되고 있다.²² 그러나 세포가 지닌 생물학적 역동성 때문에 배양의 조절이 어렵고, 생체외(*in vitro*)조건에서 나타나는 세포간의 상호작용을 생체내(*in vivo*)에서 재현시키기 매우 어렵다. 예를 들어 간 세포(hepatocyte)의 경우 생체외조건에서 배양할 경우 2주이상 간 세포로서의 기능을 하지 못하고 있으며, 체외배양후 체내로 도입하면 1주 이내에 사멸한다.²³

인체조직은 여러가지 종류의 세포로 이루어져 있기 때문에 같은 종류의 세포라고 하더라도 조직이 다르면 세포의 기능도 다르다. 예를 들어 같은 섬유아세포(fibroblast)라고 하더라도 피부에 위치한 것과 혈관벽에 위치한 것은 서로 다른 생명주기를 가지고 있다.

세포배양시에 대상이 되는 세포를 선택함에 있어 계대(lineage)를 확인하는 것은 비교적 명확하지만, 세포자체가 그 계대내에 어느 위치에 속하는지는 분

명하지 못한 경우가 많다. 예를들어 증식세포주(propagated cell line)에서는 완전분화되어 증식하지 못하는 세포에 비해 전구세포(precursor cell)가 더 많다. 그 결과 세포주가 이종(heterogeneous)의 상태가 될 수도 있게 되며 이를 이종배양이라고 한다. 예를 들어 피부각화세포(epidermal keratinocyte)를 배양하면 간세포, 전구세포, 각화표피물(keratinized squame) 등이 혼재하기 때문에 간세포의 지속적인 재생, 전구세포의 증식과 성숙에 의한 최종산물인 비가역적분화에 의한 각화표피물이 배지에 함께 존재하게 된다. 한편 섬유아세포의 경우, 약 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 정도로 적은 수를 초기배양하면 증식성세포가 균일하게 나타나지만, $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 정도의 높은 농도에서 배양하기 시작하면 잘 분화된 비증식성세포가 균일하게 나타난다. 이런 고농도의 완전분화세포가 되더라도 트립신(trypsin)처리 또는 물리적인 방법으로 세포간 결합을 분해하고 농도를 낮추면 이들 세포들은 다시 생명주기에 들어가기 시작한다. 또한 이종배양은 세포주(cell line)내에 여러 계대가 존재하더라도 나타날 수 있다.²⁴

따라서, 세포배양에 있어 단일화할 수 있는 것은 배지와 첨가제의 선택 및 최상의 성장율을 나타내는 세포형태를 취하는 것 뿐이므로 대부분의 경우 통상적인 표현형(phenotype)의 세포를 사용하지만, 세포자체가 본래 지니고 있는 성장 조절기능에 의해 유전적으로 여러 가지 다른 표현형을 가진 세포가 혼재하는 상태로 증식하게 된다.

배양세포의 초기농도외에 배지에 첨가되는 혈청(serum)이나 칼슘이온과 같은 영양소, 호르몬, 기질간의 상호작용 등은 세포의 분화와 증식에 중요한 영향을 미친다. 따라서 어떤 세포주의 어떤 계대의 세포를 사용할 것인가는 물론, 사용세포의 분화단계 확인과 세포농도의 조정 및 영양소와 호르몬의 조절에 의한 안정화시키는 것이 균일한 세포를 얻는 기본조건이 된다.²⁵

한편 섬유상 교원질로 제작한 구조체에 접착성 당 단백을 첨가하고 배양하면 일단 세포가 부착이 되더라도 일반적인 시험관내(*in vitro*) 세포배양법으로는 대부분의 경우 단층의 세포만을 얻게 되고, 세포의 생활환경도 체내환경과 다르기 때문에 배양된 세포의 기능이 저하되는 경우가 대부분이며, 그 형태도 체내에 있을 때와 다르다. 아직 체내환경과 똑같은 세포배양용 인공환경은 개발되지 않았으나, 가능한 한 유사한 생활환경을 세포에 제공하기 위해 배

양액을 이용하고, 세포의 분화와 증식을 조절하기 위해 각종 생리활성물질, 특히 성장인자를 함께 사용하며, 신선한 혈액성분과 모의체액을 배양중에 자주 제공하고, 필요에 따라서는 표피의 각질세포(keratinocyte)처럼 공기와 직접 접촉시키면서 배양하기도 한다.²⁶

조직세포를 생장능을 유지하면서 분리하여 시험관 내(*in vitro*) 환경에서 배양하기 위한 기본방법은 비교적 잘 알려져 있으며, 조직공학에서도 적당한 양의 세포를 얻기 어려울 때 세포수를 충분하도록 증가시키는 데 매우 유용하게 사용할 수 있고, 요즘은 특히 세포의 분화와 증식을 조절하는 성장인자를 첨가함으로써 예전에 비해 짧은 기간내에 대량으로 배양할 수 있게 되었다.²⁷

보통의 생물학적 용도에서는 세포를 단층으로 배양하지만 조직세포는 다층구조로 이루어져 있다. 배양된 세포가 다층구조를 가지게 하는 방법 가운데 가장 널리 사용되는 것은 교원질로 격자(lattice)를 만들고 그 속에서 세포를 배양하는 방법이며, 미리 세포와 교원질을 겔 상태로 만든 다음 세포와 직접 혼합한 다음 배양액에 첨가하여 배양하기도 하는데, 이때는 교원질을 가교화하지 못하므로 구조체를 성형할 수 없고, 물리적으로 구조체의 강도 역시 낮기 때문에 조직공학적으로는 거의 사용하지 않는다. 또한 경우에 따라서는 구조체에 혼합시킨 다음 피하(subcutaneous)에 이식하여 체내 환경에서 직접 배양하기도 한다.²⁸

6. 합성고분자와 세포외기질 복합체

지금까지 개발된 방법을 모두 동원하더라도 아직 모든 인체조직을 인공적으로 제작할 수는 없으므로, 기존의 금속, 세라믹, 합성고분자 재료가 가지고 있는 뛰어난 물성에 세포생물학적 기능을 추가하여 인공조직의 구조체로 이용을 극대화하는 방법으로써 각종 세포외기질과 복합화하는 방법이 널리 연구되고 있다.

예를 들어 합성고분자를 복합화하는 경우, 생체내 분해성 고분자로 만든 구조체내에서 세포배양하여 조직재생이 필요한 부위에 이식하면 세포는 증식하면서 조직을 재생하고 구조체인 고분자는 서서히 체내에서 분해되도록 하는 방법이 있다. 이때 사용되는 고분자로는 생체내 천연고분자인 교원질과 합성

고분자인 유산(lactic acid), 지방족 에스테르수지(polyester) 등이 있다. 그러나 혈관과 같이 구조체가 체내 이식 후에 분해되면 좋지 않은 경우도 있다. 혈관의 내막(endothelium)은 혈액과 항상 접촉하기 때문에 혈액응고가 되어서는 안되므로 합성고분자로 인조혈관을 만든 다음, 내면에 혈관 내피세포(endothelial cells)를 배양시켜 천연적인 혈액비용고 환경을 만들어 주되, 박동성(pulsative)인 혈액의 흐름을 보장할 수 있도록 인조혈관이 유체역학적인 강도를 유지해야 한다. 따라서 구조체인 합성고분자는 본래의 물리적 성질이 열화(deterioration)됨이 없이 계속 체내에 남아있어야 하기 때문에 테레프탈산 에틸렌수지(polyethylene terephthalate: PET), 4불화에틸렌수지(polytetrafluoroethylene: PTFE), 우레탄수지(polyurethane: PU) 등으로 인조혈관을 만들고 혈관내피세포를 배양하는 방법이 연구되고 있다.²⁹

한편 현재까지 발견된 여러 가지 성장인자를 사용하더라도 증식시키는 것이 어려운 세포들의 경우에는 다른 이종세포를 취하여 이용해야 하지만 이때 가장 큰 문제는 이식된 이종세포에 대한 면역학적 거부반응이다. 따라서 인슐린(insulin)을 생산하는 랑거한스섬(Langerhans islet)세포를 이식하여 당뇨병을 치료하려는 시도로써 이종의 랑거한스섬 세포를 반투성 합성고분자로 봉합(encapsulation)하여 세포와 숙주의 항체가 직접 결합하는 것을 방지하여 면역반응을 제거하되 세포로부터 생산된 인슐린의 분비는 보장하는 방법이 연구되고 있다. 또한 1997년 5월에는 미국에서 적혈구를 에틸렌글라이콜수지(polyethyleneglycol: PEG)에 봉합하여 혈액형에 따른 수혈거부반응을 회피하도록 만들어 어떤 혈액형이나 수혈이 가능하도록 처리하는 방법을 발표하였다. 본고에서는 합성고분자 표면에 교원질을 포함한 단백질 세포외기질을 복합화하는 방법을 중심으로 한다.³⁰

조직공학에서는 우레탄수지와 같이 체내 비이물형으로서 생체적합성이 높은 이식용 고분자재료의 표면을 처리하여 재료가 지닌 물성의 장점을 최대한으로 이용하면서 세포가 생장능을 발휘할 수 있도록 하는 방법과, 산의 수소기를 탄화수소기로 치환한 지방족 에스테르 중합체를 처럼 체내에서 분해되고 흡수되는 재료로 구조체를 만들어 조직과 일체화시키는 방법이 대상이 된다. 지방족 에스테르 중합체가 체내에 이식되면 효소의 촉매반응이 없더라도 주쇄

(back bone)에 포함된 에스테르 결합이 가수분해되어 단량체 단위로 완전히 녹아 체내에 흡수된다. 특히 유산중합체나 글라이콜중합체(poly glycol)와 그 공중합체들은 대표적인 물질로서 그동안 체내 흡수형 봉합사나 골고정판(bone plate) 등에 사용되어 왔으며, 자연상태에서도 체내 대사산물로 존재하기 때문에, 이들은 분해되더라도 인체내 혈액공급이 충분한 조직에서는 무해하다. 본래 pH가 약 2.5~3에 이르는 강한 산성인 이들 단량체는 체액과 순환되는 혈액이 있으면 희석되어 주위조직에 무해하지만, 이들을 시험관내 환경에서 사용하면 분해되면서 생성된 산이 희석되지 않으므로, 이들을 기질로 사용하여 세포를 배양할 때에는 지속적인 완충액의 사용을 요구한다.³¹

한편 합성고분자를 조직구조체로서 사용할 때 세포막에 존재하는 각종 싸이토카인(cytokine), 호르몬, 세포외기질 등에 대한 수용체가 반응할 수 있는 배위자를 합성고분자에 고정하여 인공적으로 세포에 대한 친화성을 갖추면 세포와 합성고분자 사이의 배위자-수용체 상호작용에 의해 세포가 합성고분자 표면에 접착하여 일체화될 수 있다.

교원질이나 화이브로넥틴, 라미닌, 비트로넥틴과 같은 접착성 당단백질을 비이물형 합성고분자 표면에 고정화하여 주위세포가 재생할 수 있는 배위자를 가진 인공기질을 제공하기 위해 고분자표면에 존재하는 아미노(NH₂)기는 디알데하이드(dialdehyde)로 처리하고, 수산(OH)기의 경우는 디사이아노산(dicyanate)으로, 카복실(COOH)기는 카보디이미드(carbodiimide)로 처리한 다음 배위자로 고정시킬 단백질의 아미노기와 결합시켜 고정시키는 방법이 널리 사용되고 있다(그림 8). 또한 세포의 접착만 유도하기 위해서 접착성 당단백질분자 전체를 고정화하지 않고, 이들 분자에 공통적으로 존재하는 세포접착 배위자인 RGD서열만 고분자표면에 고정화하여 세포가 이들 배위자에 접착시키는 방법도 사용되고 있다. 생명공학에서 사용하는 단백질 합성기(protein synthesizer)를 이용하여 인공적으로 RGD 펩타이드를 합성한 다음 합성고분자와 복합화함으로써 인공적으로 세포가 접착할 수 있는 구조체를 만드는 것이다.³² 대개 단백질 합성기는 체내 mRNA의 아미노 말단에서부터 펩타이드가 합성되는 것과는 달리 카복실 말단을 이용하고 있다. 카복실기를 가진 개시아미노산 분자의 관능기를 우선 보호한 다음, 합성에 사용될 아미노산을 개시아미노산 분자와 반

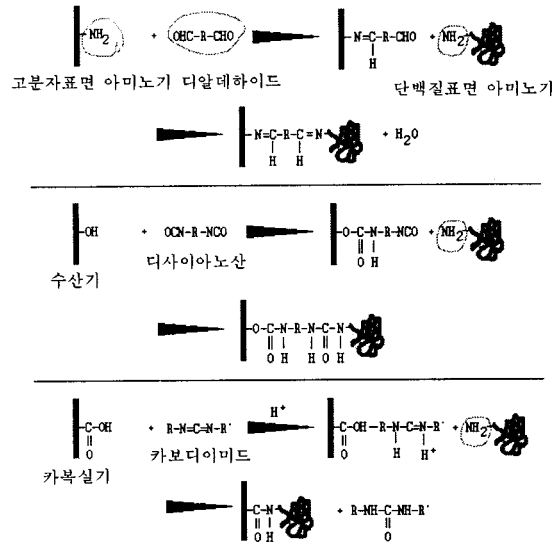


그림 8. 고분자표면에 존재하는 아민, 수산, 카복실기와 단백질의 측쇄에 풍부하게 존재하는 아민을 공유결합하여 고분자표면을 복합화하는 방법.

응시켜 펩타이드 결합을 형성시키고 개시아미노산의 알파-아미노(α -amino)보호기를 제거하는 반응을 연속적으로 진행한 다음, 최종적으로 모든 보호기를 제거하므로써 원하는 서열을 가진 펩타이드를 생산한다.³³ 단백질 합성기로 생산한 RGD서열은 천연 당단백질이 가진 세포접착기능을 충분히 발휘하는 것으로 알려져 있다. 그리고 세포표면의 당류에 대한 수용체가 가진 기능을 이용할 때에는 이들 당류를 고분자표면에 고정화하기도 한다. 예를 들어 수명을 다한 혈청단백질은 변성되면서 갈락토즈(galactose)를 가지게 되고, 이들 갈락토즈는 간세포(hepatocyte)표면에 있는 갈락토즈 수용체와 결합하여 혈액으로부터 제거된다. 따라서 간 세포만 특이적으로 결합하는 재료로써 소수성 고분자인 스타일렌중합체(polystyrene)표면에 갈락토즈를 공유시켜 간 세포가 접착할 수 있도록 하기도 한다.³⁴

7. 조직공학의 실제

본고에서는 대표적인 조직공학의 산물로서 경조직으로서 인공 골(bone)과 연조직으로서 인공 피부(skin)에 대하여 기술하고자 한다.

7.1 인공골

골조직은 생체재료가 가장 먼저 사용된 기록을 가

지고 있다. 금속으로 만든 골고정재료는 지금까지 각종 골격계 손상 수복을 위한 재료선택에 있어 최우선적으로 고려되고 있으며, 이후 생체내에 이식하면 골조직과 직접 결합하는 수산화아파타이트(hydroxyapatite)와 같은 생체내 비이물형 세라믹과 함께, 최근에는 이식후 생체내에서 가수분해되어 재생골조직으로 치환되는 생체내 흡수형고분자인 유산중합체(PLA)로 제작한 골고정판과 나사도 이미 사용되기 시작하고 있다.³⁵ 그러나 이들은 모두 골의 재생을 능동적으로 유도하지 못하기 때문에, 골질환이나 선천적 기형에 의한 결손부에 자연골이 생성되도록 하기 위해 인공골에 대한 연구가 시작되었다.

조직공학적으로 골을 재생시키기 위하여 가장 먼저 발표된 방법은 소의 장골(femur)을 탈회(demineralization)시켜 골조직의 구조체인 I형 교원질의 골연속성이 유지된 탈회골(demineralized bone: DMB)을 골결손부에 이식하면 이들이 세포의 기질과 유사한 작용을 하여 주위의 골아세포(osteoblast)의 증식을 촉진시킨다는 결과가 보고되어 임상에서도 이용하기 시작하였으며,³⁶ 1990년대 중반이후에는 골흡수성 세라믹인 3인산칼슘(tricalcium phosphate: TCP)과 비흡수성 세라믹인 수산화아파타이트(hydroxyapatite)로 이루어진 무기질과 교원질을 복합화하고 글루타알데하이드로 가교화한 인공골을 이식하여 골재생이 확인되어 실용화를 위한 연구가 활발하다. 그러나 이 경우 소의 교원질을 원료로 하기 때문에 면역반응이 일어나기 쉽고, 재생골로 치환되는 것이 복합화된 TCP가 분해된 위치에 국한되고 나머지 복합화한 수산화아파타이트는 영구적으로 분해되지 않으며, 교원질 가교를 위해 사용한 글루타알데하이드의 잔류 독성에 의한 2차 골괴사 등과 같은 부작용이 일어날 수 있고, 특히 골의 연속성이 있는 결손부위에만 사용이 가능하다는 점이다.³⁷

이를 해결하기 위해 연세대의 의학공학교실에서는 골의 자연성분인 탄산아파타이트(carbonate apatite)와 사람유래의 교원질 또는 생분해성 합성고분자인 PLA와 PGA를 복합화하거나, 골조직성장인자로 알려지고 있는 골형성단백질(bone morphogenetic protein: BMP)을 복합화하여 골연속성이 없이 완전 절단된 부위는 물론 골이 존재하지 않는 부위에서도 필요한 양의 골을 형성하도록 유도할 수 있는 인공골에 대한 연구가 진행중이다. BMP는 매우 적은 분자량(약 12-30 kDa)을 가진 당단백(glycoprotein)으로서 기본구조의 약 40-50%가 TGF-

β 와 유사하고, 특히 BMP-2와 -7은 간세포가 골아세포나 연골아세포로 분화되는 것을 촉진하므로, 사람의 BMP를 생명공학적으로 재조합한 rhBMP-2를 PLA와 PGA 복합 미세구에 포매한 다음 교원질과 다시 복합화하여 골 고적이 전무한 쥐의 복부에 이식한 결과 약 3주후에 완전한 형태의 골조직이 생성된 것을 확인하였다(그림 9).³⁸

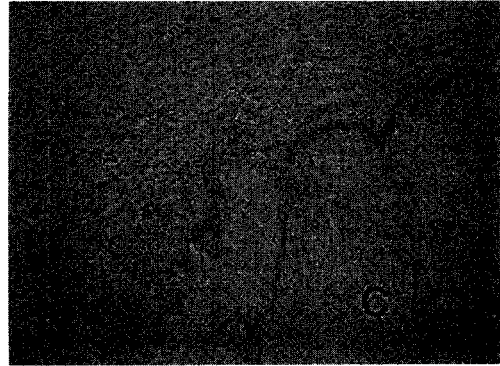
7.2 인공진피

피부는 체액의 유출을 막아주고, 세균 등 외부로부터 인체를 보호하며, 체온을 조절하고, 촉각과 같은 지각기능을 하는 매우 중요한 기관이다. 화상 등에 의해 피부의 1/3이상을 잃게 되면 체액이 유실되고 진피가 외부로 직접 노출되어 감염에 대해 무방비 상태가 되면서 패혈증(septicemia)에 의해 사망하므로 결손된 피부는 가능한 한 빨리 외부로부터 보호되어야 한다. 일반적으로 2도이내의 가벼운 화상의 경우처럼 피부의 손상이 표피에 국한될 경우에는 피부조직의 재생이 가능하지만 진피가 포함되면 재생이 되지 않기 때문에 자가피부를 이식하는 것이 통례이다. 그러나 이식하기까지는 역시 일정기간 환부를 피복하여 보호하여야 한다. 따라서 인공피부는 최소한 적당한 수분의 투과성을 가지되 세균 등과 같은 외부환경을 차단하며 인체를 보호할 수 있는 기능을 할 수 있어야 한다.³⁹

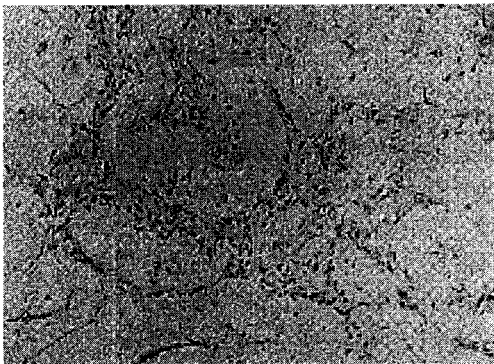
지금까지 임상에서는 손상부위를 보호하기 위한 막을 주로 사용하고 있으며 흔히 창상보호제(wound dressing)라고 한다. 동결건조한 돼지피부, I형 교원질막, 사람의 양막(placenta), 카이틴 등 천연 조직재료와 우레탄중합체, 로이신중합체(poly-L-leucine) 등과 같은 합성고분자 막을 사용하고 있으나 이들은 면역반응이 쉽게 일어나서 탈락하기 쉽거나 분해속도가 빠르기 때문에 장기간 효과적으로 창상을 피복하기 어려운 문제가 있다. 따라서 적극적으로 피부를 재생하기 위해 생체적합성이 우수한 생체유래의 인공피부를 만들어 자가피부이식을 대체하기 위해 적당한 수분투과성 고분자막과 생체접착성 구조체를 복합화한 막을 만들어 피부조직이 재생되면 탈락하도록 설계된 것들이 있으며, 이를 조직유도피복제(tissue conductive dressing)이라고 부르기도 한다. 그 가운데 비교적 성공적인 것이 1980년대 초에 발표된 바이오브레인(biobrane)으로서, 미세한 다공성 실리콘막과 나일론막 및 나일론 직조체로 3층막 구조 위에 I형 교원질을 피복한 구조를 가지고 있으며, 피부와의 밀착성이 좋고 신축성도



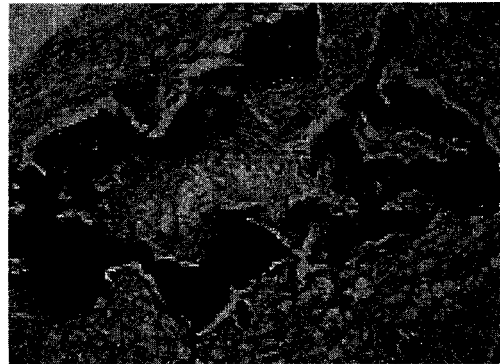
BMP, 교원질, PLA, PGA 복합체



이식후 3일(C: 복합체)



이식후 7일 성유성 가골 형성



이식후 21일 자가골조직 형성

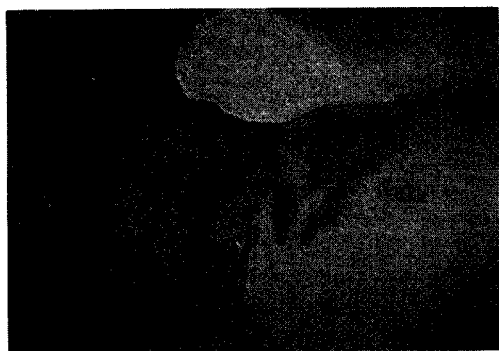
그림 9. 재조합 골형성단백질을 교원질/PLA/PGA 복합체에 포매한 다음 쥐의 복부에 이식한 실험. 21일후, 복합체는 소멸되고 연조직내에 자연골이 형성된 것을 보여준다.

있기 때문에 창상면에 잘 부착되며 실리콘막을 통해 일상적으로 도포한 항생제가 환부에 전달될 수도 있는 장점을 가지고 있어 2도이내의 화상 또는 같은 정도의 피부박리 상태의 창상에 널리 사용되고 있다.⁴⁰ 한편 1980년대 중반에 미국의 Yannas는 다공성 실리콘막에 교원질과 콘드로이틴-6-황산(chondroitin-6-sulfate)복합체로 만든 스폰지구조체를 복합화한 막을 개발하였다. 환부에 부착하면 모세혈관과 섬유아세포가 스폰지내로 증식해 들어가고, 스폰지와 실리콘막 사이에 주위로부터 표피세포가 증식하여 전체면적을 덮으면 실리콘막이 탈락하게 된다.⁴¹ 한편 연세대의 생체재료연구실에서는 교원질과 라미닌(laminine) 복합 다공막에 항생제를 포매한 하이알론산(hyaluronic acid) 미세구를 함유시켜 제작한 인공진피를 3도화상에 이식하여 진피의 재생을 확인하였다(그림 10).⁴²

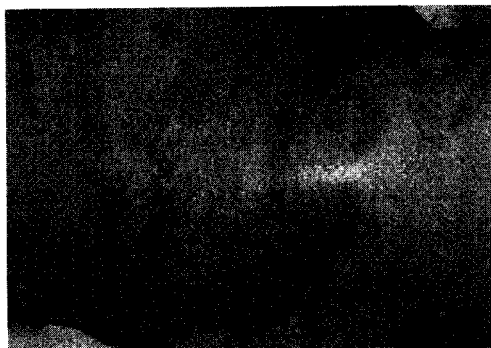
그러나 위와 같은 방법으로는 재생피부는 본래의 모든 기능을 완벽하게 수행할 수 없다. 이를 위해 자

가세포를 인공적으로 배양하여 사용하는 방법이 고안되고 있으며, 그 대표적인 것으로는 교원질 겔내에 진피세포를 배양한 다음 그 위에 표피세포를 다시 배양하는 Bell의 방법과, 섬유아세포를 단층배양한 다음 그 위에 표피세포만을 배양하는 Green의 방법이 있다. Bell의 방법은 자가피부로부터 박리하여 배양한 섬유아세포를 트립신으로 처리하여 분산액을 만든 다음, 교원질용액과 혼합하여 37℃에서 배양하면 경시적으로 교원질 겔이 수축하도록 하여 진피와 유사한 형태의 생체구조체를 만들고, 그 위에 자가표피세포를 배양하여 교원질 겔상의 인공 진피구조체 위에 인공 표피세포층을 만들어 이식하는 방법으로 3-5일 후에는 모세혈관이 구조체내로 증식한다고 보고되었다. 이 방법은 자가피부와 거의 비슷한 구조를 가지고 있으나 만드는 기간이 20일 이상으로 매우 오래 걸리므로 빠른 시간내에 피부를 보호해야 하는 광범위한 손상부위에는 이용할 수 없을 것으로 보인다.⁴³

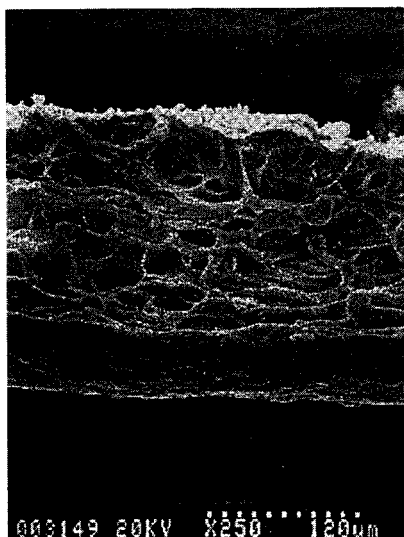
한편 Green은 섬유아세포를 단층으로 배양한 다



3도 화상



이식후 28일



다공성 교원질-라미닌 복합 인공진피(SEM상)

그림 10. 다공성 교원질막을 3도화상 부위에 이식한 사진. 4주후 진피가 완전히 재건되었음을 보여준다.

음 방사선으로 처리하여 증식능을 없앤 다음 그 위에 상피세포성장인자(epithelial cell growth factor: EGF)가 첨가된 배지에서 표피세포만을 배양하여 이식하면, 진피가 하방으로부터 자연스럽게 재생하도록 하므로써 비교적 단기간내에 인공적으로 피부부의 재생을 유도하는 인공피부의 개념에 가장 가까운 방법을 발표하였다.⁴⁴ 그러나 이들 방법은 자가세포의 배양을 전제로 하고 있어 제작에 소요되는 기간이 적어도 7일 이상이 요구되므로, 그 동안 감염과 체액손실을 완벽하게 차단할 수 있는 또 다른 문제에 대한 해결이 필요하다. 또한 피부는 사람에 따라 색이 다르고 모발이 존재하며, 질감(texture)도 다르기 때문에 심미적인 문제까지 해결해야 하는 문제를 가지고 있다.

8. 결 론

인체의 구조를 형성하고 생명기능을 유지하는 물질은 대부분의 경우 세포와 생물학적으로 생성된 고분자형태로 존재한다. 다당류나 단백질은 그 대표적인 존재로서, 이들은 인체내에 존재하는 물질이기 때문에 만일 인공적으로 이들을 사용할 때에 면역에 의한 거부반응만 없다면 가장 천연상태에 가까운 형태를 부여하는 것은 물론, 생장기능까지 갖춘 인체조직을 재구축할 수 있다고 기대할 수 있다.

따라서 조직공학은 세포를 포함한 천연조직을 의료용 생체재료로 사용하여 무기물이나 합성고분자 등에는 결여되어 있는 생물학적 기능을 제공함으로써 인체내에 삽입된 무생물 생체재료와 주위조직사이에서 생체적합성을 지니도록 환경을 제공하거나, 더 나아가서 인간복제와 같은 윤리적 갈등을 해소하면서 천연조직과 같은 생조직의 역할을 할 수 있도록 만드는 것을 목적으로 하며, 이를 위해 2000년대에는 기존의 생체재료를 뛰어 넘어 생물학적 기능을 갖춘 새로운 구조체용 고분자의 개발이 기대된다.

참 고 문 헌

1. R. M. Nerem and A. S. Sambanis, *Tissue Engineering*, **1**, 3 (1995).
2. S. E. Fox, "Human Physiology", 4th ed., Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA, 1993.
3. H. Suh, *Yonsei Med. J.*, **39**, 87 (1998).
4. H. Suh, *Biomater. Res.*, **2**, 1 (1998).
5. J. E. Beesley, "Immunocytochemistry-A Practical Approach", Oxford University Press, Oxford, England, 1993.
6. O. Morton, *Science*, **278**, 798 (1997).

7. D. Freifelder, "Molecular Biology", 2nd ed., Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, 1987.
8. M. M. Bloomfield and L. J. Stephens, "Chemistry and the Living Organism", 6th ed., John and Wiley & Sons, New York, N.Y., 1996.
9. G. J. Barritt, "Communication within Animal Cells", Oxford University Press, Oxford, England, 1992.
10. D. A. Lauffenburger and H. S. Wiley, *Tissue Engineering*, **1**, 81 (1995).
11. H. Suh, "Tissue Engineering for Artificial Organs", Yonsei Univ. Press, 1999.
12. F. H. Silver, "Biomaterials, Medical Devices and Tissue Engineering", Chapman & Hall, London, England, 1994.
13. H. Suh, *J. Korean Med. Assoc.*, **40**, 451 (1997).
14. J. Bujan and N. Garcia-Honduvilla, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 32 (1998).
15. H. Suh, *J. Korean Med. Assoc.*, **40**, 451 (1997).
16. M. E. Nimni, "Collagen", CRC Press, Boca Raton, FL, 1988.
17. S. J. Ahn, Y. S. Kim, and H. Suh, *J. KOSOMBE*, **17**, 479 (1996).
18. E. A. Trowbridge, P. V. Lawford, C. E. Crofts, and K. M. Roberts, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **95**, 577 (1988).
19. H. Suh, W. K. Lee, J-C. Park, and B. K. Cho, *Yonsei Med. J.*, **40**, 159 (1999).
20. M. E. Nimni, B. S. Cheung, M. Kodama, and K. Sheikh, *J. Biomed. Mater. Res.*, **21**, 741 (1987).
21. R. Ian Freshney, "Culture of Animal Cells", 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1994.
22. D. Asselineau, B. Bernhard, C. Bailly, and M. Darmon, *Exp. Cell Res.*, **159**, 536 (1985).
23. P. V. Moghe and F. Berthiaume, et al., *Biomaterials*, **17**, 373 (1996).
24. P. J. Skerett, *Science*, **252**, 1064 (1991).
25. J. C. Y. Dunn, R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush, *J. Cell Biol.*, **116**, 1043 (1992).
26. P. R. Bilbo and C. J. M. Nolte, et al., *J. Toxicol. Cut. Ocular. Toxicol.*, **12**, 183 (1993).
27. A. Colige, B. Nusgens, and C. M. Lapiere, *Arch. Dermatol. Res.*, **280**, 42 (1988).
28. H. P. Ehrlich and J. B. M. Rajaratnam, *Tissue Cell*, **22**, 407 (1990).
29. H. P. Greisler and D. Petsikas, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 955 (1993).
30. M. Aboubakar and F. Puisieux, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 568 (1999).
31. N. Saito and T. Okada, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 104 (1999).
32. J. S. Burmeister and V. Z. McKinney, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 577 (1999).
33. E. Atherton and R. C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis", IRL Press, Oxford, England, 1989.
34. D. W. Whalen, Z. Ding, and R. L. Fournier, *Tissue Engineering*, **5**, 81 (1999).
35. K. G. Mara and J. W. Szem, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 324 (1999).
36. J. P. Ivory and I. H. Thomas, *J. Bone and Joint Surg.*, **75-B**, 355 (1993).
37. D. Knaack and M. E. P. Goad, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.*, **43**, 399 (1998).
38. H. Suh and D. H. Lee, et al., *Biomater. Res.*, in press (2000).
39. F. Martini, "Anatomy and Physiology", 2nd ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1992.
40. D. Heimbach and A. Luterman, et al., *Ann. Surg.*, **208**, 313 (1988).
41. I. V. Yannas and J. K. Burke, et al., *Science*, **215**, 174 (1982).
42. J. E. Lee and K. H. Lee, et al., *Biomater. Res.*, in press (2000).
43. E. Bell and P. Ehrlich, et al., *Science*, **221**, 1052 (1981).
44. H. Green, O. Kehinde, and J. Thomas, *Prot. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5665 (1979).