

인간 제대혈 유래 간엽줄기세포의 연골세포 분화

정미현⁽¹⁾ · 양성은⁽¹⁾ · 진혜진 · 이만경 · 송호선 · 양정윤 · 양윤선 · 하철원*

메디포스트(주) 생명공학연구소, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 정형외과학교실*, 삼성생명과학연구소

목적: 인간 제대혈로부터 간엽성 섬유세포양 세포를 분리, 배양함으로써 제대혈 내의 순환성 간엽줄기세포의 존재 여부를 확인하고, 이의 연골세포 분화능을 증명하고자 하였다.

대상 및 방법: 총 50 유니트의 제대혈로부터 분리된 유착성 세포군의 세포형태 및 면역표현형을 분석하였다. BMP-6을 첨가하였거나 또는 첨가하지 않은 연골분화 배양액을 이용하여 펠렛 배양의 형태로 연골분화를 유도 배양하였다. 연골세포로의 분화를 관찰하기 위해 역전사 중합효소연쇄반응을 수행하였으며, Safranin-O 염색과 제2형 콜라겐에 관한 면역염색을 시행하였다.

결과: 제대혈 단핵세포로부터 균질성의 섬유세포양 형태의 유착성 세포군이 배양되었다. 이 세포군은 간엽줄기세포 관련 항원 양성, 조혈모세포항원 음성, 조직적합항원 음성, 내피세포 및 파골세포 관련 항원 음성이었다. 연골분화 펠렛 배양 시 BMP-6을 첨가한 군에서 펠렛의 크기 및 연골세포관련 인자의 발현이 증가하였고, Safranin-O 염색과 제2형 콜라겐의 면역염색도 강양성이었다.

결론: 제대혈 내에 순환성 비조혈성 연골형성 간엽줄기세포가 존재함을 확인하였고, 연골분화 배지에 BMP-6을 첨가함으로써 제대혈 유래 비조혈성 간엽줄기세포의 시험관 내 연골분화의 효율을 향상시킬 수 있었다.

색인 단어: 인간 제대혈, 간엽줄기세포, 연골분화, BMP-6

Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood

Mee Hyun Jung, Sung-Eun Yang, M.D., Hae Jin Jin, Man Kyoung Lee, Ho Sun Song, Jung Yoon Yang, Yoon Sun Yang, M.D., and Chul-Won Ha, M.D.*

Medipost Biomedical Research Institute, Yongin; *Department of Orthopedic Surgery, Samsung Medical Center, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University, School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The aim of this study was to demonstrate the existence of circulating mesenchymal stem cells (MSC) in the human umbilical cord blood (hUCB) and to evaluate the chondrogenic differentiation potential of hUCB-derived MSC *in vitro*.

Materials and Methods: Fifty hUCB harvests were cultured in media supplemented with 10% fetal bovine serum. The adherent fibroblast-like cells were characterized by immunophenotyping and induced to differentiate into chondrocytes in the pellet culture with and without BMP-6. This study performed RT-PCR of the chondrogenic markers, Safranin-O stain and type II collagen immunohistochemical stain.

Results: The mononuclear cells isolated from hUCB formed adherent colonies with an attached well-spread fibroblast-like morphology. The cells positively expressed the MSC-related antigens, but did not express the hematopoietic, HLA-DR, endothelial, or osteoclast antigens and could be induced to differentiate into chondrocytes under proper stimulation. BMP-6 increased the size of the pellet and the mRNA levels for aggrecan, type II collagen and type IX collagen and enhanced the levels of proteoglycan synthesis during chondrogenic differentiation.

통신저자 : 하 철 원
서울시 강남구 일원동 50
성균관대 삼성서울병원 정형외과, 삼성생명과학연구소
TEL: 02-3410-0275 · FAX: 02-3410-0084
E-mail: hacw@smc.samsung.co.kr

Address reprint requests to
Chul-Won Ha, M.D.
Department of Orthopedic Surgery, Samsung Medical Center, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University, School of Medicine, 50 Ilwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea
Tel: +82.2-3410-0275, Fax: +82.2-3410-0084
E-mail: hacw@smc.samsung.co.kr

*본 논문은 2003년도 과학기술부 21세기 프론티어사업 세포응용연구사업의 연구개발비 지원을 받아 이루어졌음.
(1): 공동 제 1저자 임.

Conclusion: The homogenous fibroblast-like cells developed in cultures from hUCB with chondrogenic differentiation potential were considered to be MSC. Furthermore, it was found that BMP-6 enhanced chondrogenic differentiation of the hUCB-derived MSC in the pellet culture.

Key Words: Human umbilical cord blood, Mesenchymal stem cells, Chondrogenic differentiation, BMP-6

골수를 이용한 조혈모세포이식은 줄기세포를 이용한 치료기술의 좋은 모델로서, 조혈모세포 이상과 관련된 질환, 즉 백혈병, 재생불량성 빈혈, 면역질환 등 다양한 질환의 치료에 활발히 이용되고 있다. 또한 골수는 조혈모세포 외에 각종 간엽조직으로 분화기능이 있는 간엽줄기세포를 포함하고 있다^{11,15}. 간엽줄기세포는 성숙한 간질세포와는 달리 미분화세포 상태로 증식함과 동시에 뼈나 연골, 지방, 건(腱), 근육 및 골수 간질 등 간엽계에서 유래하는 여러 조직으로 분화할 수 있는 능력을 갖춘 세포이다^{3,14,17}.

현재까지 조혈모세포 및 간엽줄기세포의 가장 좋은 자원은 골수이나 간혈적 채취로 인해 공여자에게 고통을 주고, 연장자일수록 줄기세포의 기능이 감소하는 등의 단점이 있어, 최근에는 제대혈(umbilical cord blood, UCB)이 훌륭한 조혈모세포원으로 임상에서 이용되고 있다⁴. 또한 제대혈 내에 존재하는 비조혈성 세포 성분 중에는 간엽성 섬유세포양 세포 등의 존재가 보고되어 있다².

간엽줄기세포의 연골 분화는 Owen 등¹에 의해 처음으로 보고되었으며, Johnstone 등⁷에 의해 연골분화 성장 인자인 tissue growth factor $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$)를 이용한 세포의 3차원 분화유도 배양의 방법이 보고되었다. 최근에는 Sekiya 등¹⁸이 골수 간질세포에서 BMP-6이 시험관내 연골분화 유도 배양에 효과적임을 보고한 바 있다.

Bone morphogenic protein (BMP)은 골형성유도 단백질로 TGF- β superfamily의 일종이다. 현재까지 알려진 BMP는 약 20여종이 있으며 그 중 재조합된 BMP-2, BMP-4, 그리고, BMP-7 등은 여러 다양한 실험상에서 골 형성 및 연골 분화에 관여한다고 보고되어 있다¹². 이 중 BMP-6은 미성숙 연골세포⁵ 및 연골세포주인 ATDC5 세포⁶의 단층배양에서 type X collagen mRNA의 발현 수준을 증가시키며, 또한 미성숙 연골세포를 이용한 펠렛 배양의 결과 연골분화를 촉진시키는 중요한 인자임이 확인되었다⁸.

본 연구에서는 인간 제대혈로부터 간엽성 섬유세포양 세포를 분리, 배양하여 세포 표면항원의 표현양상을 확인하여 제대혈 내 간엽줄기세포의 존재 여부를 확인하고, 제대혈 유래 간엽성 줄기세포의 연골 형성능을 확인하였다. 또한 BMP-6이 제대혈 유래 간엽줄기세포의 연골분화에 미치는 영향을 관찰하고 연골세포분화능 증진을 도모하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 제대혈 채취 및 세포배양

본 연구에서는 총 50 유닛의 제대혈이 이용되었다. 분만 전 산모로부터 제대혈 채취 및 연구에 관한 동의를 받은 후 동의서(informed consent)를 작성하였다. 채취된 제대혈로부터 Ficoll-Hypaque 용액(1.077 g/cm³, Sigma, St. Louis, MO)을 이용한 원심분리(400 g, 35분) 방법으로 저밀도 단핵세포층을 분리하였다. 분리한 단핵세포층을 10% 우태혈청(HyClone, Logan, UT)을 포함한 α -minimum essential medium (α -MEM, HyClone) 배지에 세포수 3.0×10^5 /cm²의 농도로 분주하여 배양하였다. 배양조건은 5% 이산화탄소 배양기에 37°C, 습도 95% 이상을 유지하였으며, 배양액은 1주일마다 교환하였다. 제대배양 시 세포수는 1×10^4 /cm²로 분주하였으며 배양조건은 일차 배양과 동일한 조건에서 배양하였다.

2. 면역표현형 분석

세포 표면항원의 면역표현형을 분석하기 위하여 다음과 같은 항체들을 반응시켰다. 조혈관련항원으로 CD45, CD34, CD14, 조직적합항원으로 HLA-DR (이상 Becton Dickinson, San Diego, CA), 내피세포항원으로 CD31, 파골세포 항원으로 CD51/61, integrin 수용체 관련항원으로 CD29, CD49, matrix 수용체 관련항원으로 CD44, CD106 (이상 Pharmingen, San Diego, CA), 기타 항원으로 CD13 (Becton Dickinson), CD64, CD90 (이상 Pharmingen)이었다. 간접반응에 이용된

항체는 간엽줄기/전구세포 관련항원인 SH2, SH3, SH4 (Osiris Therapeutics, Baltimore, MD)에 대한 항체였으며, 그에 대한 이차항체로서 IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 이용하였다. 반응 후 분석은 FACSCalibur 유세포분석기(Becton Dickinson)와 CELLQUEST (Becton Dickinson) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

3. 연골분화

연골분화 배양을 위하여 2세대부터 8세대의 배양된 세포 총 10 유니트의 제대혈 유래 간엽줄기세포들이 이용되었다. 우태혈청이 포함되지 않은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone) 배지에 2×10^5 개의 세포수로 15 mL polypropylene tube에 넣은 후 원심 분리하여 3차원 배양을 위한 펠릿을 얻었으며 6주간 분화 배양하였다. 연골세포 분화배지는 10 ng/mL TGF- β 3, 10^{-7} M dexamethasone, 50 μ g/mL ascorbic acid, 40 μ g/mL proline, 100 μ g/mL pyruvate (이상 Sigma) 그리고 50 mg/mL ITS+ Premix (Becton Dickinson)를 포함하는 DMEM 배지를 사용한 군과 이에 500 ng/mL BMP-6 (R&D System, Minneapolis, MN)을 첨가한 군으로 나누어 연골세포분화를 비교 배양하였다. 연골세포로 분화유도된 펠릿의 크기를 측정하기 위하여 i-solution 소프트웨어(IMTechnology, Doosan, Daejeon)를 사용하여 분석하였으며, BMP-6 미첨가군과 첨가군 사이의 펠릿 크기를 측정하여 비교하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄반응

연골분화 후 3주째의 펠릿을 이용하여 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하였다. RNA를 추출하기 전 펠릿을 0.2% collagenase type IA (Sigma) 용액으로 37°C에서 3시간 동안 효소 분해하였다. 총 RNA는 각각의 샘플로부터 TRIzol (Invitrogen Technology, Grand Island, NY)을 이용하여 추출하였다. cDNA 합성을 위하여 0.5 μ g의 RNA를 동일하게 사용하였으며 superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen Technology)을 사용하였다. 합성된 cDNA와 각각의 primer를 첨가 후 Taq DNA polymerase (Invitrogen Technology)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 시

행하였다. 역전사 중합효소연쇄반응을 시행한 대상 유전자 및 각각의 annealing 온도와 반응산물의 크기는 Table 1과 같다.

5. 면역조직화학 염색

연골세포로의 분화를 관찰하기 위해 분화 후 2주, 4주, 6주에 각각 Safranin-O 염색과 type II collagen에 대한 면역염색을 시행하였다. 펠릿을 고정시킨 후 4 μ m 두께로 박리하여 슬라이드 절편을 준비하였다. Proteoglycan 합성정도를 관찰하기 위하여 0.1% Safranin-O 용액으로 염색하였다. Type II collagen 면역 염색을 위하여 mouse antihuman type II collagen (Oncogene, Cambridge, MA)을 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰으며, DAKO EnvisionTM+ System, HRP (DAB) Kit (DakoCytomation, Carpinteria, CA)를 이용하여 면역 염색을 수행하였다.

결 과

1. 세포 형태학적 특성

제대혈로부터 분리된 단핵세포는 배양 후 3-5일부터 방추형(spindle-shaped)의 긴 모양인 섬유세포양 형태와 원형의 단핵성 혈구세포가 혼합된 형태로 배양되기 시작하였다. 총 50 유니트의 제대혈 중 20 유니트로부터 섬유세포양 형태의 균질성 세포집락을 얻을 수 있었으며, 제대배양 후 2-3세대 경에는 세포의 형태가 95% 이상 방추형의 섬유세포 모양의 균질한 세포임을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 그와 같은 제대혈 유래 균질성의

Table 1. Primer sequences and PCR conditions of target genes

Target Gene	Primer Sequences	Annealing Temperature	Size of PCR Product
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	57°C	452 bp
Aggrecan	5'-TCAGGAGGGCTGGAACAAGTACC-3' 5'-GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA-3'	57°C	392 bp
Collagen II	5'-TTTCCCAGGTCAAGATGGTC-3' 5'-CTTCAGCACCTGTCTCACCA-3'	55°C	377 bp
Collagen IX	5'-CCCCCTCCCAGCCACAAGA-3' 5'-TCTTGGTCGGTGGTGGACTCT-3'	57°C	159 bp
Sox-9	5'-GGTTGTTGGAGCTTTCCTCA-3' 5'-TAGCCTCCCTCACTCCAAGA-3'	57°C	401 bp

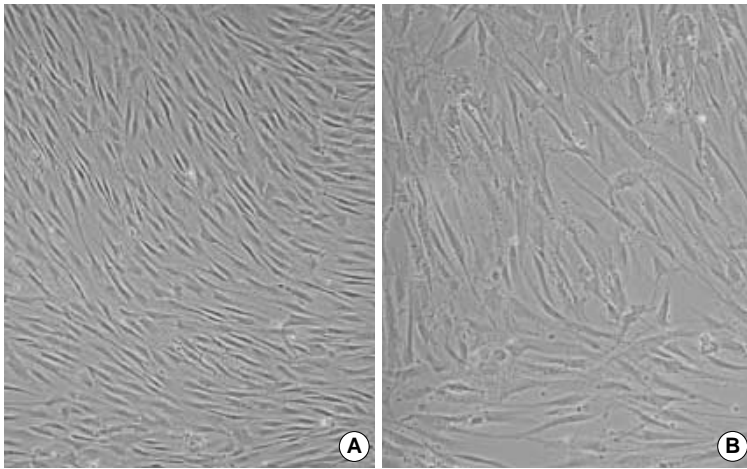


Fig. 1. Photomicrographs showing confluent fibroblast-like adherent cells from primary cultures of human umbilical cord blood (A) at passage 5 ($\times 100$) and (B) at passage 15 ($\times 100$). Homogeneous population of bipolar spindle-shaped cells was obtained. No significant morphological changes were observed at the advanced passage.

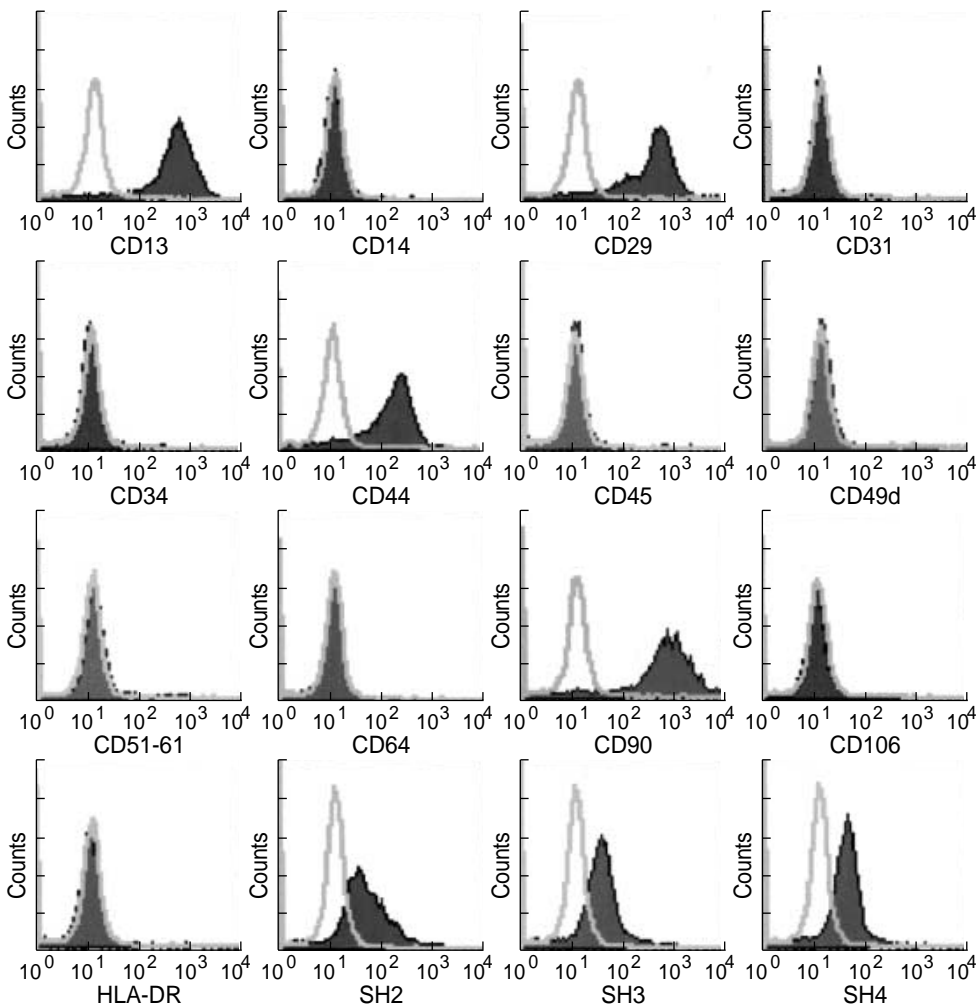


Fig. 2. Flow cytometry characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. These cells positively expressed CD13, CD29, CD44, CD90, SH2, SH3 and SH4. These cells did not express the myeloid markers (CD45, CD34, CD14), histocompatibility antigen (HLA-DR), endothelial marker (CD31), or osteoclast antigen (CD51/61). These expression patterns of multiple CD antigens were similar to those observed on bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

유착성 섬유세포양 세포군은 평균 10세대, 최고 18세대 까지 균질한 방추형의 섬유세포양 형태를 비교적 잘 유지하면서 계대배양이 가능하였다(Fig. 1B).

2. 면역표현형 분석

제대혈로부터 배양된 섬유세포양 형태의 균질성 세포군에 대해 유세포분석기를 이용해 면역표현형을 분석하였다. 균질성의 섬유세포양 형태의 세포집락이 관찰된

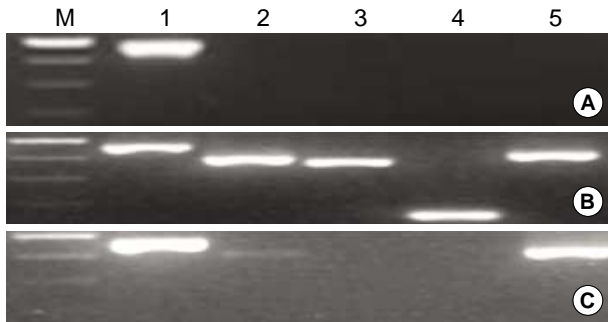


Fig. 3. mRNA expression of chondrogenic markers as detected by reverse transcription-polymerase chain reaction at 3 weeks. Expression of (1) GAPDH, (2) aggrecan, (3) type II collagen, (4) type IX collagen and (5) Sox-9 were examined using RNA isolated from the human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in different chondrogenic differentiation media (A: pre-induction, B: BMP-6+TGF- β 3+dexamethasone, C: TGF- β 3+dexamethasone).

20 유니트 중 10 유니트에 대해 면역표현형을 분석한 결과, 골수 유래 간엽줄기세포 관련 항원인 SH2, SH3, SH4에 대해 양성이었으며, 95% 이상 균질한 양상을 나타내었다. 조혈모세포항원(CD34) 음성, 조혈관련항원(CD45, CD14) 음성, 조직적합항원(HLA-DR) 음성, 내피세포항원(CD31) 음성, 파골세포항원(CD51/61) 양성이었다. 그 외 integrin 수용체 관련항원 중 CD29는 양성, CD49d는 음성이었으며, matrix 수용체 관련 항원은 CD44 양성, CD106 음성이었다. 기타 항원으로 CD13 양성, CD90 양성 그리고 CD64는 음성이었다(Fig. 2).

3. 연골분화

제대혈 배양을 통해 얻은 균질성의 섬유세포양 형태의

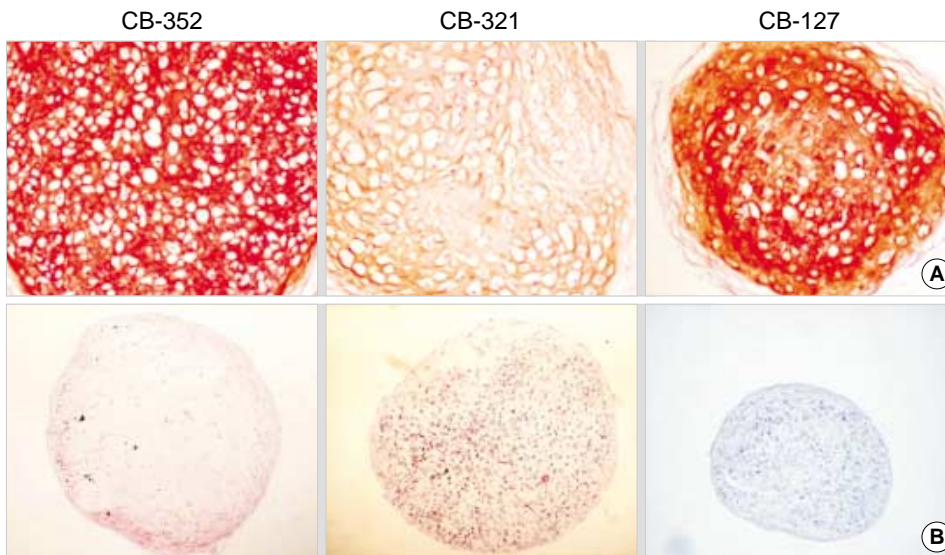


Fig. 4. Proteoglycan synthesis of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-derived MSC) in chondrogenic media (A) with BMP-6 (Safranin O stain, $\times 200$) and (B) without BMP-6 (Safranin O stain, $\times 200$) at 6 weeks. BMP-6 enhanced the proteoglycan synthesis and increased the pellet size in chondrogenic differentiation of hUCB-derived MSC from different donors.

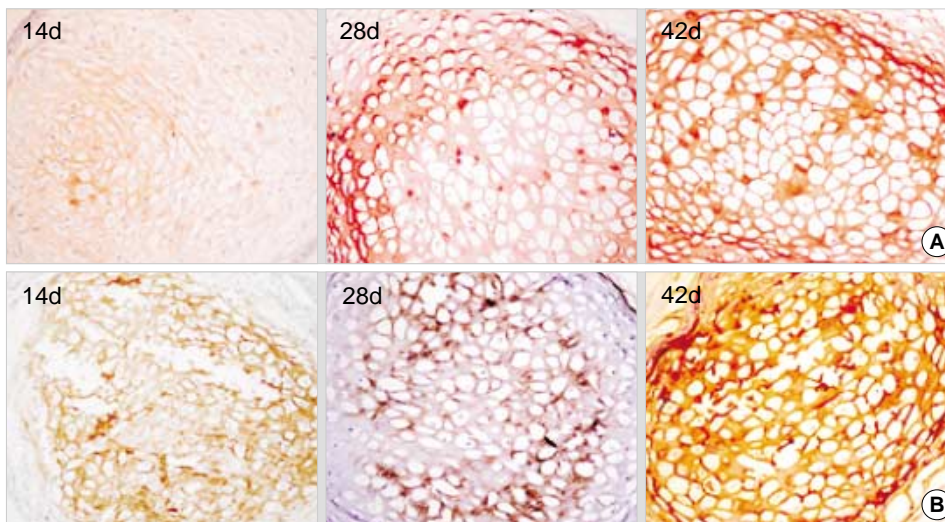


Fig. 5. Time course of synthesis of proteoglycans and type II collagen from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in chondrogenic media with BMP-6. Frozen sections were (A) stained with Safranin-O ($\times 200$) and (B) immunostained against type II collagen ($\times 200$) at day 14, 28 and 42, respectively. Proteoglycan and type II collagen contents were increased throughout the course of differentiation.

세포들을 연골분화 배지에 배양하면서 배양 3주째 aggrecan, type II collagen, type IX collagen, Sox-9에 관해 역전사 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 그 결과 연골세포분화 전 단계에서는 연골세포분화 관련유전자가 음성이었으나(Fig. 3A), 연골세포분화 3주째 BMP-6을 첨가한 군에서 연골세포표지 인자인 type II collagen이 발현되었다. 또한 aggrecan, type IX collagen 그리고 연골세포의 분화를 유도하는 전사 인자 중 하나인 Sox-9가 모두 발현되었다(Fig. 3B). 그러나, BMP-6 없이 TGF- β 3과 dexamethasone 등을 처리한 군에서는 aggrecan과 Sox-9는 발현 되었지만, type II collagen은 발현되지 않았다(Fig. 3C). Proteoglycan의 합성정도를 비교하기 위하여 Safranin-O 염색을 수행한 결과, 배양 6주째 BMP-6을 첨가한 군에서는 제대혈 유니트에 따라 정도의 차이는 있었으나 10 유니트 제대혈 모두에서 Safranin-O 염색의 결과가 양성이었다(Fig. 4A). 그러나, TGF- β 3과 dexamethasone 등을 처리한 군에서는 부분적으로만 Safranin-O 염색이 양성이었다(Fig. 4B). 또한 BMP-6을 첨가한 군의 펠렛 크기가 첨가하지 않은 것에 비해 최고 5.04 배, 최저 1.42배(평균 3.39배, n=10) 증가하였다.

연골분화 배지에 TGF- β 3, dexamethasone, BMP-6 등을 첨가하여 2주부터 6주까지 Safranin-O 염색과 type II collagen에 대한 면역 염색을 시행한 결과는 Fig. 5와 같다. BMP-6을 첨가한 군은 2주째부터 펠렛의 단면에서 연골소강 형태의 세포가 관찰되며 분화 시기가 지남에 따라 연골기질 및 연골소강 형태의 세포수가 증가하였다. Safranin-O 염색의 경우, 2주째부터 연골소강 형태 세포의 주변 기질부터 발색 되었으며 연골분화배양 시간이 지날수록 양성률이 증가하였다. 또한 type II collagen의 면역염색 결과의 경우, 분화 배양 2주째부터 양성을 나타내었으며 분화 말기인 6주째 강양성을 보여 연골세포 표지 인자인 type II collagen의 합성이 일어남을 확인하였다. 또한 BMP-6을 첨가한 군은 Safranin-O 염색과 Type II collagen의 면역 염색을 통하여 분화기간 동안 탈분화가 일어나지 않음을 확인하였다.

고 찰

성체줄기세포는 생체 내에 이식된 후 장기의 특성에 맞

게 분화하는 장기 특이적 분화(site-specific differentiation) 능력을 가지고 있으며, 몇몇 성체줄기세포는 이식 후 본래의 세포특성과 다른 종류의 장기세포로 교차분화(trans-differentiation)할 수 있는 형성성(stem cell plasticity)을 가지고 있다^{3,9)}. 최근에는 성체줄기세포가 더 다양한 세포로 분화될 수 있는 만능성(pluripotency)이 있는 것으로 밝혀지면서 성체줄기세포를 통한 다양한 조직의 치료 가능성을 높이고 있다¹⁶⁾.

본 연구에서는 인간 제대혈로부터 성장인자 등을 첨가하지 않고 10% 우태혈청만을 포함하는 기본배지로 배양하여 40%의 제대혈에서 간엽성 섬유세포양 세포를 얻을 수 있었다. 제대혈로부터 배양된 균질성의 섬유세포양 세포군은 골수 유래 간엽줄기/전구세포 관련 항원인 SH2, SH3, SH4가 양성임을 확인하였다. 또한 조혈관련 항원 음성, 조직적합항원 중 HLA-DR 음성, 내피세포항원 음성, 파골세포항원 음성이었으며, 체외에서 세포 형태의 변화 없이 대량으로 계대배양이 가능하였다. 본 연구에서 관찰된 제대혈 유래 균질성 유착성 섬유세포양 세포군은 형태학적으로나 면역 표현형적으로 골수 유래 간엽줄기세포의 특성과 동일하였다¹⁰⁾.

연골세포의 분화과정에서 BMP-6이 연골분화에 관여한다는 사실은 연골세포의 발생 과정 및 골수 간질세포의 연골분화능 증진의 결과를 통해 이미 보고되어 있다¹⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 Pittenger 등¹⁴⁾에 의해 보고된 연골분화 배양액의 주요 성분인 TGF- β 3과 dexamethasone 등을 처리한 군과 TGF- β 3, dexamethasone, BMP-6 등을 처리한 군으로 연골분화를 비교 배양하여, 성장인자의 하나인 BMP-6이 제대혈 배양을 통해 얻은 균질성의 섬유세포양 형태의 세포들의 연골분화능에 미치는 영향을 관찰하였다. 본 연구의 결과, 제대혈 유래 간엽줄기세포는 시험관 내 연골분화 유도시 연골세포로 분화되고 연골조직의 대표인자인 proteoglycan과 type II collagen을 합성하는 등 골수를 통해 얻어지는 간엽줄기세포와 동일한 양상을 나타내었다. 뿐만 아니라 연골분화능을 증진시키기 위해 BMP-6을 첨가하여 각 세대가(2-8세대) 다른 10 유니트의 제대혈 모두에서 연골로 분화됨을 확인할 수 있었다.

최근 조직 재생 및 질환 치료에 간엽줄기세포를 이용한 조직공학적 접근과 그에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 제대혈 내에 존재하는 순환성

비조혈성 간엽줄기세포의 존재를 확인하였고, BMP-6을 이용하여 제대혈 유래 간엽줄기세포의 시험관 내 연골분화의 효율을 향상시킨 바, 향후 제대혈 유래 간엽줄기세포를 이용한 연골재생을 위한 임상적 응용에 도움이 될 것으로 사료된다.

결론

인간 제대혈로부터 분리, 배양된 균질성의 유착성 섬유세포양 세포군은 형태학적, 면역표현형적으로 간엽줄기세포로 사료되며, 시험관내에서 연골세포로 분화가 가능하였다. 본 연구의 결과로 제대혈내에 순환성 비조혈성 연골형성 간엽줄기세포가 존재함을 확인하였으며, 연골분화 배지에 BMP-6을 첨가함으로써 시험관내 연골분화의 효율을 향상시킬 수 있었다.

참고문헌

1. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A and Owen M: Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop*, 313: 294-307, 1980.
2. Erices A, Conget P and Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 109: 235-242, 2000.
3. Geiger H, Sick S, Bonifer C and Muller AM: Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell*, 93: 1055-1065, 1998.
4. Gluckman E: Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 28: 1197-1205, 2000.
5. Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, et al: BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res*, 14: 475-482, 1999.
6. Ito H, Akiyama H, Shigeno C and Nakamura T: Bone morphogenetic protein-6 and parathyroid hormone-related protein coordinately regulate the hypertrophic conversion in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5. *Biochim Biophys Acta*, 1451: 263-270, 1999.
7. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU: In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 238: 265-272, 1998.
8. Kameda T, Koike C, Saitoh K, Kuroiwa A and Iba H: Analysis of cartilage maturation using micromass cultures of primary chondrocytes. *Dev Growth Differ*, 42: 229-236, 2000.
9. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105: 369-377, 2001.
10. Majumdar SA, Mankani MH, Gronthos S, Satumura K, Bianco P and Robey PG: Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*, 176: 57-66, 1998.
11. Minguell JJ, Erices A and Conget P: Mesenchymal stem cells: minireview. *Exp Biol Med*, 226: 507-520, 2001.
12. Pecina M, Jelic M, Martinovic S, Haspl M and Vukicevic S: Articular cartilage repair: the role of bone morphogenetic proteins. *Int Orthop*, 26: 131-136, 2002.
13. Deans RJ and Moseley AB: Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 28: 875-884, 2000.
14. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147, 1999.
15. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276: 71-74, 1997.
16. Reyes M and Verfaillie CM: Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, 938: 231-235, 2001.
17. Satomura K, Krebsbach P, Bianco P and Robey PG: Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. *J Cell Biochem*, 78: 391-403, 2000.
18. Sekiya I, Colter DC and Prockop DJ: BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284: 411-418, 2001.