

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2019-0098335 (43) 공개일자 2019년08월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/074 (2010.01)	(71) 출원인 (주)오스힐 서울특별시 구로구 가마산로 226 ,4층(구로동, 고려구로빌딩) 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(52) CPC특허분류 C12N 5/0696 (2013.01) C12N 2501/999 (2013.01)	(72) 발명자 송해용 서울특별시 구로구 경인로 65길 16-15, 1102동 101호 (신도림동, 신도림4차e-편한세상) 김학준 서울특별시 강남구 선릉로 221, 302동 1702호 (도곡동, 도곡렉슬아파트) (뒷면에 계속)	
(21) 출원번호 10-2018-0018141	(74) 대리인 특허법인충현	
(22) 출원일자 2018년02월14일 심사청구일자 없음		

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **생분해성 나노입자 또는 고분자 스캐폴드를 이용한 유도만능줄기세포 유도 방법**

(57) 요약

본 발명은 유도만능줄기세포 유도물질에 탑재한 생분해성 나노입자 및/또는 상기 나노입자에 융합된 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드 및 이를 이용한 유도만능줄기세포의 효율적인 유도방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

(72) 발명자

김성은

서울특별시 양천구 목동서로 397, 2001호 (신정동,
대림아크로빌)

이재용

경기도 광주시 행정타운로 143-38, 105동 302호(회
덕동, 상록파크타운)

심규식

경기도 광명시 연서로12번길 19, 201호(철산동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9B3063640

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발

연구과제명 근골격계 질환 동물 모델 이용하여 줄기세포치료제 후보군 유효성 검증

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.30 ~ 2022.06.29

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 단계를 포함하는 성체줄기세포를 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)로 유도하는 방법:

- a) 유도만능줄기세포 유도물질을 생분해성 나노입자에 탑재하는 단계 및
- b) 성체줄기세포를 분주하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 생분해성 고분자 스캐폴드를 제작하여 상기 유도만능줄기세포 유도물질이 탑재된 생분해성 나노입자와 융합하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포 유도물질은 5-Aza(5-azacytidine) 또는 발프로산(valproic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

유도만능줄기세포 유도물질이 탑재된 생분해성 나노입자를 포함하는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유도용 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 유도만능줄기세포 유도물질은 5-Aza(5-azacytidine) 또는 발프로산(valproic acid)인 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포의 유도용 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 생분해성 나노입자 또는 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리락타이트, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오스, 해파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블렌딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유도만능줄기세포의 유도용 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 유도만능줄기세포 유도물질을 탑재한 생분해성 나노입자 및/또는 상기 나노입자에 융합된 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드 및 이를 이용한 유도만능줄기세포의 효율적인 유도방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 유도만능줄기세포는 특정한 유전자를 인위적으로 발현시켜 비만능세포인 성체세포를 유도할 수 있는 만능줄기세포이다. 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 같은 자연적인 만능줄기세포와 많은 면이 비슷하다. 즉 특정한 줄기세포 유전자와 단백질의 발현, 염색질 메틸화 패턴, 배가시간, 배아유사세포덩어리 형성, 기형종 형성, 생존가능한 키메라 형성, 그리고 세포잠재력과 세포분화력이 비슷하다. 유도만능줄기세포는 쥐세포로부터 2006년에 처음 생산되었고 2007년에는 인간세포로부터 생산되었다.
- [0004] 논란의 여지가 되는 배아의 사용을 필요로 하지 않고 연구와 치료에 잠재적으로 사용될 수 있는 만능줄기세포를 얻을 수 있기 때문에 유도만능줄기세포는 줄기세포 연구에 중요한 발전으로 인용되어 왔다.
- [0005] 2008년 2월, 획기적인 발견이 과학잡지 Cell에 발표되었는데, 다능성을 유도시킨 후 종양유전자를 제거하는 기술이 연구되어 인간 질병에 유도만능줄기세포의 사용 가능성을 증가시켰다. 2009년 4월에는 캘리포니아 La Jolla의 Sheng Ding과 그의 동료들은 성체세포의 유전적 변화 없이 유도만능줄기세포 발생이 가능하다는 것을 보였다. 즉, 특정한 단백질을 폴리아르지닌 고정(poly-arginine anchors)을 통해 세포안으로 넣어 줌으로서 세포의 다능성(pluripotency)을 유도하였다.
- [0006] 상기 유도만능줄기세포를 보다 안정적 및 효율적으로 유도하고자 하는 다양한 시도들이 있어왔다. 하지만, 아직까지 상기 유도만능줄기세포의 유도에 조직공학적 방법을 이용하는 것은 효과적인 성과를 나타내지 못하고 있는 실정이다.
- [0008] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 생분해성 나노입자 및/또는 생분해성 고분자 스캐폴드를 이용한 유도만능줄기세포의 효율적인 유도 방법을 찾고자 노력하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 유도만능줄기세포 유도물질을 생분해성 나노입자에 탑재하는 단계를 포함하는 성체줄기세포를 유도만능줄기세포로 유도하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 유도만능줄기세포 유도물질이 탑재된 생분해성 나노입자를 포함하는 유도만능줄기세포 유도용 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드를 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 하기의 단계를 포함하는 성체줄기세포를 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)로 유도하는 방법을 제공한다:
- [0017] a) 유도만능줄기세포 유도물질을 생분해성 나노입자에 탑재하는 단계 및
- [0018] b) 성체줄기세포를 분주하는 단계.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 생분해성 고분자 스캐폴드를 제작하여 상기 유도만능줄기세포 유도물질이 탑재된 생분해성 나노입자와 융합하는 단계를 추가적으로 포함한다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 유도만능줄기세포 유도물질이 탑재된 생분해성 나노입자를 포함하는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 유도용 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드를 제공한다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 유도만능줄기세포 유도물질은 5-Aza(5-azacytidine) 또는 발프로산(valproic acid)인 것이다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 생분해성 나노입자 또는 고분자는 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리아미노산, 폴리락타이트, 폴리포스파진, 폴리이미노카보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리언하이드라이드, 폴리오르소에스테르, 폴리히드록시발레이트, 폴리히드록시부티레이트, 히아루론산, 셀룰로오스, 헤파린, 콜라겐, 알지네이트 및 키토산 중에서 선택되는 어느 하나; 이들 둘 이상이 블렌딩된 고분자; 및 이들 둘 이상의 공중합체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 유도만능줄기세포 유도물질을 탑재한 생분해성 나노입자 및/또는 상기 나노입자에 융합된 3차원 생분해성 고분자 스캐폴드 및 이를 이용한 유도만능줄기세포의 효율적인 유도방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0031] 1. Polycaprolactone (PCL) 스캐폴드 제작 방법

[0032] DMSO 10 ml에 Acetone 10 ml을 더한 용액에 PCL 4 g을 넣고 60℃에서 500 rpm으로 용해시켰다. 용해된 혼합액을 50℃로 설정된 히팅블럭 위에서 예열한 뒤 RP 장비용 주사기에 PCL 용액을 주입하고, 상기 주사기에 플런저를 넣고 주사기 안의 공기를 빼준 뒤 25G 니들을 주사기에 장착하였다. 상기 주사기를 어답터 어셈블리 주사기에 연결시키고, 오토메틱 디펜서(Model : AD 3000C, IWASHITA, 일본)에 있는 에어 프레서를 작동시켜서 PCL 용액이 잘 나오는지 확인하고 PCL 용액이 들어있는 주사기를 히팅 블록에 고정시켜 준 뒤 본체 부분에 100% 알코올 200ml이 들어있는 15 x 4cm 디쉬를 올렸다. RP 기기의 공기압을 55 Kpa로 설정하고, 속도는 5 mm/sec 로 설정한 후, 래피드 프로토타이핑(rapid prototyping) 기기를 작동시켜 PCL 스캐폴드를 제작하였다.

[0034] 2. Valproic acid (Val)가 탑재된 생분해성 나노입자 제작 방법

[0035] DCM 10 ml에 Valproic acid (Val)을 100 μ g을 섞어 준 다음 PLGA(폴리락타이드-코-글리콜라이드) 200 mg을 넣고 1시간 동안 200 rpm으로 교반하여 완용 시켰다. 완용 후, 주사기(26 Gauge)로 옮겨 PVA (0.1 wt%) 용액 100 ml이 든 500 ml 비커를 4℃로 유지 시켜주며 호모제나이저 21,500 rpm으로 작동 시키고 주사기(26 Gauge)에 든 Valproic acid와 PLGA가 든 용액을 한 방울씩 분사한다. 30분간 21,500 rpm으로 균질 한다. 비커에 magnetic bar를 넣고 stirrer 위에서 300 rpm으로 밤새도록 유기용매를 증발시킨다. 이후, 50 ml tube에 옮겨 담아서 3,000 rpm으로 원심분리 하고 상층액을 버린다. D.W 30 ml 넣고 washing 한 뒤 동결건조 하여 Valproic acid가 1 ml 당 10 μ g이 탑재된 생분해성 나노입자를 제작 하였다.

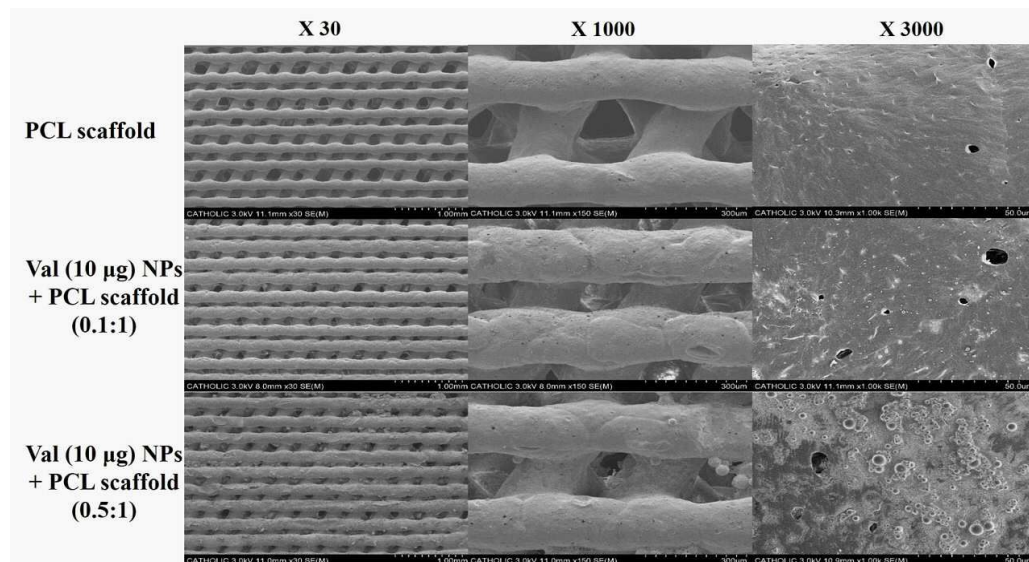
[0037] 3. Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 제작 방법

[0038] PCL 스캐폴드에 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자를 고정화 ((Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 : PCL 스캐폴드 무게비 = 0.1:1 및 0.5:1) 하기 위해, Lysine 2 mg을 0.1 M MES 버퍼 (pH 5.6) 1 ml에 녹인 후

PCL 스캐폴드를 넣고 밤새도록 교반한 후, 3-4회 증류수로 세척한 후 동결 건조를 하였다. 동시에 Val (10 μ g) 이 탑재된 생분해성 나노입자는 Hep-DOPA 2 mg을 0.1 M MES 버퍼 (pH 5.6) 1 ml에 녹인 후, Hep-DOPA 개질된 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자를 제조하였다. PCL 스캐폴드에 Val (10 μ g)이 탑재 생분해성 나노입자를 ((Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 : PCL 스캐폴드 = 0.1:1)) 고정화하기 위하여, Val (10 μ g) 탑재된 생분해성 나노입자 3 mg을 0.1M MES 버퍼(pH 5.6) 넣은 후, Lysine 개질된 PCL 스캐폴드 추가하여 밤새도록 교반한 후, 3-4회 증류수로 세척한 후 동결 건조하여 Val (10 μ g) 탑재 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1:1) 제조하였다. PCL 스캐폴드에 Val (10 μ g)이 탑재 생분해성 나노입자를 ((Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 : PCL 스캐폴드 = 0.5:1)) 고정화하기 위하여, Val (10 μ g) 탑재 생분해성 나노입자 15 mg을 0.1 M MES buffer(pH 5.6) 넣은 후, Lysine 개질된 PCL 스캐폴드 추가하여 밤새도록 교반한 후, 3-4회 증류수로 세척한 후 동결 건조하여 Val (10 μ g) 탑재 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5:1) 제조하였다.

4. 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM) 분석

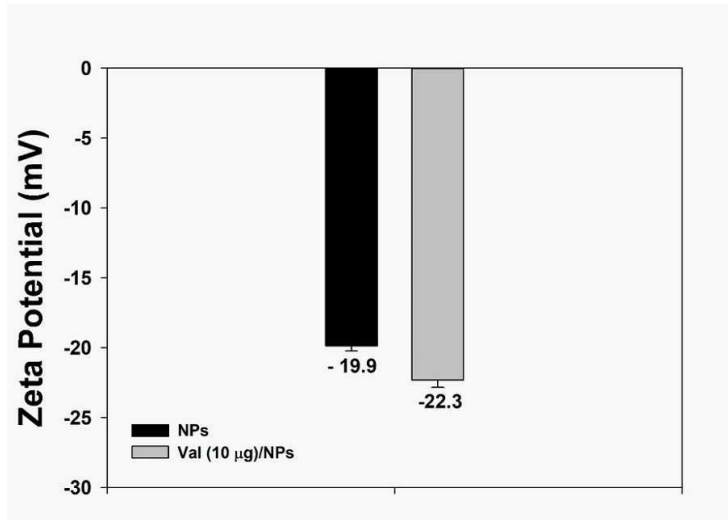
PCL 스캐폴드, Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1) 그리고 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1) 를 주사 전자현미경으로 각각 30배, 1000배, 3000배 사진을 도시하였으며, Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자가 농도별로 탑재된 PCL 스캐폴드의 전자현미경상에서 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자가 잘 탑재 되어 있는 것이 관찰되었다.



[도 1]. PCL 지지체, Val (10 μ g) 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1:1) 및 Val (10 μ g) 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5:1) 주사전자현미경 사진

5. 제타전위 (Zeta potential) 분석

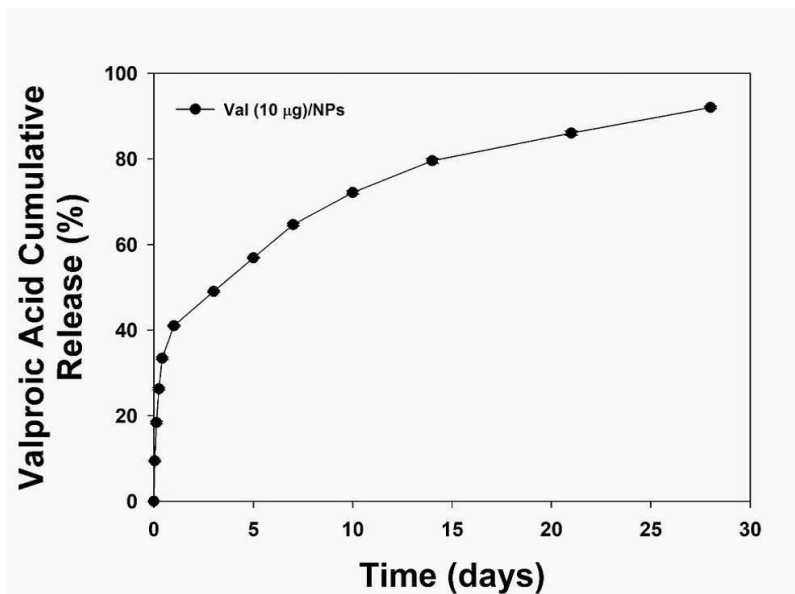
제타전위 (Zeta potential)를 이용하여 NPs 표면 전위차를 분석한 결과를 보면, Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자의 표면 전위차가 가장 커서 NPs 보다 더 많은 음전하를 띠는 것을 확인할 수 있었다.



[도 2] 생분해성 나노입자 및 Val (10 µg) 탑재된 생분해성 나노입자 제타전위 결과

6. Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자의 약물 방출 거동 분석

Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자의 방출 거동을 분석하기 위하여, Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 30mg/ml를 투석막(dialysis membrane; MWCO 6,000~8,000)에 넣고 1 mL의 PBS 버퍼(pH 7.4)와 함께 37°C에서 100 rpm으로 교반하면서 시간(1시간, 3시간, 6시간, 10시간 및 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 21일, 28일) 경과에 따른 약물 방출량을 확인하였으며, 측정 후에는 새로운 버퍼로 교환하였다. 방출되는 발프로산(valproic acid)을 적외선 및 기사광선 분석기(DU-530, Beckman Coulter™, USA)를 이용하여 244 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 발프로산 (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자는 초반 1일 동안에는 탑재하고 있던 약물이 다소 빠르게 방출되기는 하였으나, 그 이후로 4주 동안 탑재된 약물이 지속적으로 방출되는 특성을 보였다.

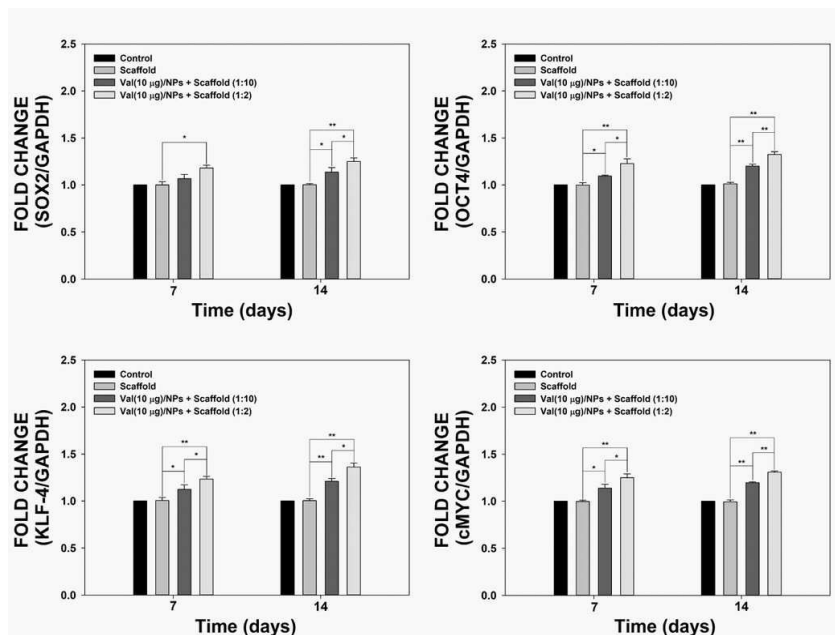


[도 3] 발프로산 방출거동 확인

7. 유전자 발현을 통한 유도만능줄기세포(IPSCs) 마커 확인

PCL 스캐폴드, Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신

(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 이용하여 7 및 14 일 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기(real-time PCR)로 분석하였다. 분석 결과 iPSCs 마커인 SOX2, OCT4, KLF-4 및 cMYC는 7 및 14 일 동안 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2) 분주된 지방유래줄기세포는 유도만능줄기세포 마커(SOX2, OCT4, KLF-4 및 cMYC) 발현하였고, 또한 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에서 가장 많이 발현하였다. 이런 결과로 보면, Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드에 분주된 지방유래줄기세포는 발프로산 서방성 방출을 통하여 유도만능줄기세포로 유도되는 것을 확인하였다.

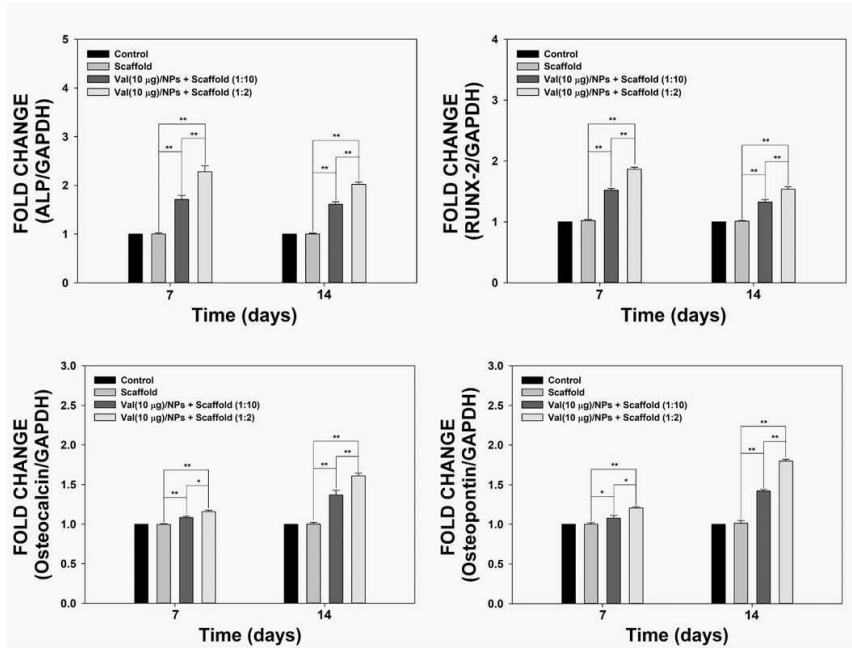


[도 4] PCL 스캐폴드, Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 7 및 14 일 동안 배양하여 유도만능줄기세포 (iPSCs) 유도 확인을 실시간 연쇄중합반응기기 확인 결과

8. 유전자 발현을 통한 골 분화 마커 확인

발프로산은 유도만능줄기세포 유도 및 골분화 유도하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구는 유도만능줄기세포 유도를 유지하면서 골 분화 유도하는지 확인하기 위하여, PCL 스캐폴드, Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)] 이용하여 7 및 14 일 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기로 분석하였다. 분석 결과 초기 골 분화 마커(ALP 및 RUNX-2) 및 후기 골 분화 마커(Osteocalcin 및 Osteopontin)는 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μ g)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2) 분주된 지방유래줄기세포 7 및 14 일 발현하였으나, PCL 스캐폴드는 초기 및 후기 골 분화 마커는 발현되지 못하였다. 이것을 미루어 보아

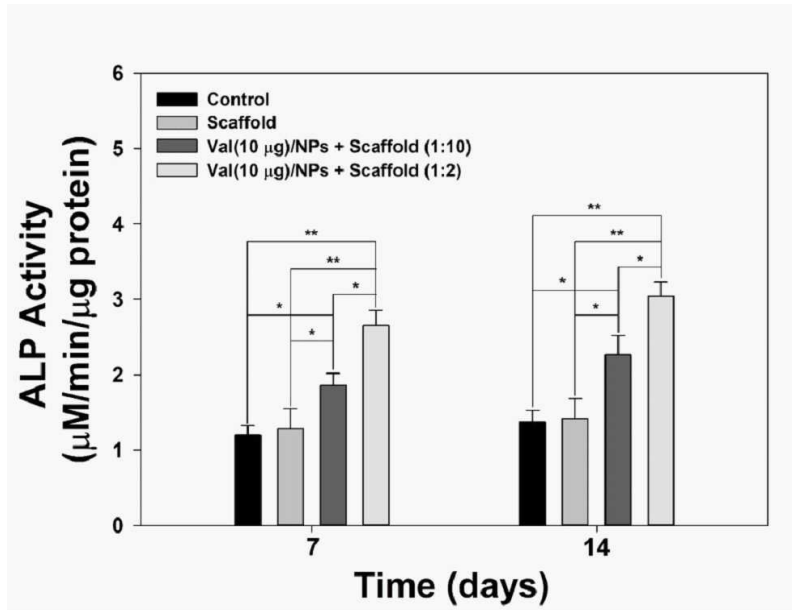
Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드에 의해서 골 분화에 효과적인 것을 확인하였다.



[도 5] PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 7 및 14 일 동안 배양하여 골분화 유도 확인을 실시한 연쇄중합반응기기 확인 결과

9. 알칼리성 포스파타제 활성도 평가

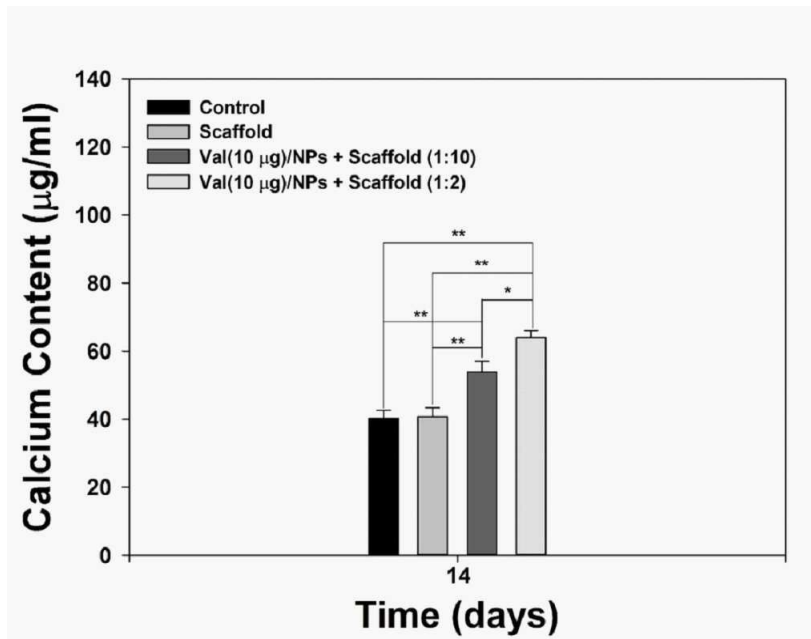
조골세포의 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도 측정을 위하여, PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^5 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco' s modified Eagle' s medium, GIBCO)]이용하여 7 및 14 일 동안 배양하였다. 배양 7일 및 14일 후 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, Tris-EDTA 용액으로 각각의 스캐폴드로부터 세포를 떼어내었다. 상기 세포에 1×RIPA 버퍼를 주입하고 4℃에서 110 W로 1분 동안 초음파 처리하였다. 다음으로 용해된 세포를 4℃에서 3분 동안 13,500 rpm 으로 원심분리한 뒤, 상층액에 p-니트로페닐포스파테이트 용액을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 500 mL의 1 N NaOH로 반응을 종결시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 분주된 지방유래줄기세포에서 알칼리성 포스파타제 활성도가, PCL 스캐폴드에 비교하여 월등히 증가하였다.



[도 6] PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^5 으로 분주 후, 7 및 14 일 동안 배양하여 알칼리성 포스파타제 활성도 확인 결과

10. 칼슘 침착 평가

조골세포의 후기 분화 마커인 칼슘 침착 정도를 측정하여, PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^5 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)]이용하여 14 일 동안 배양하였다. 배양 14일 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, Tris-EDTA 용액으로 각각의 스캐폴드로부터 세포를 떼어내었다. 떼어낸 세포는 13,500 rpm으로 1분간 원심분리 한 뒤, 0.1 % 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣고, 65°C에서 3시간 보관 후 초음파를 가하여 세포의 막을 분쇄하고, 원심분리를 하였다. 상층액을 분리한 뒤, QuantiChrom™ Calcium Assay 키트를 이용하여 612 nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착 정도를 분석하였다. 측정 결과, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 분주된 지방유래줄기세포에서 칼슘침착 농도가 PCL 스캐폴드에 비교하여 유의성 있게 증가하는 것으로 평가되었다.



[0072]

[0073]

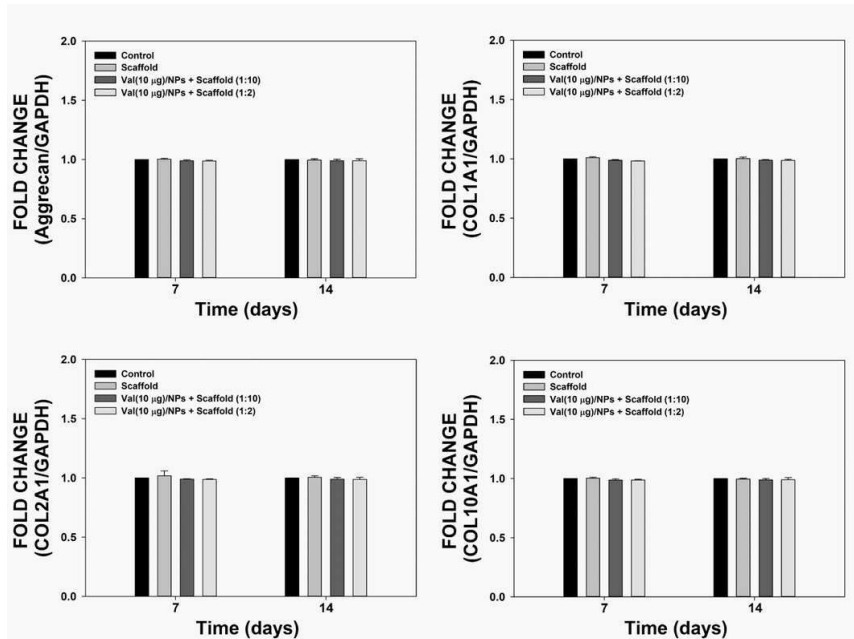
[도 7] PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^5 으로 분주 후, 14 일 동안 배양하여 칼슘침착 농도 확인 결과

[0075]

11. 유전자 발현을 통한 연골 분화 마커 확인

[0076]

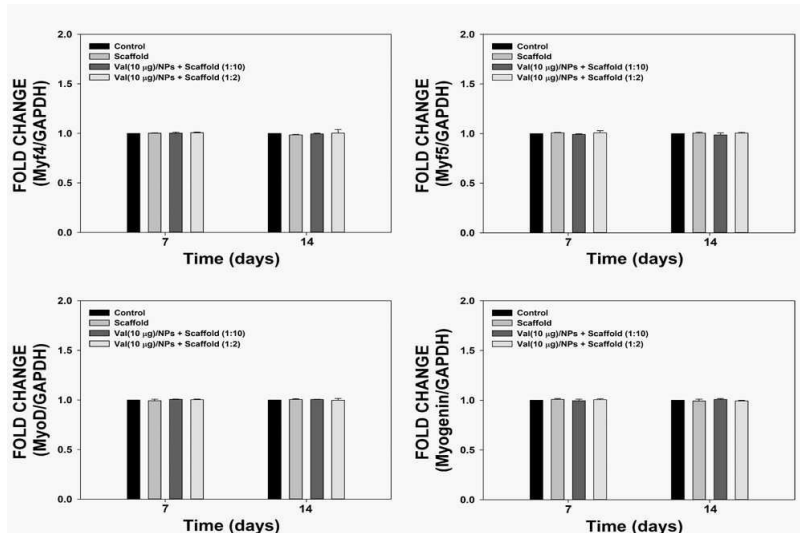
PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)]이용하여 7 및 14 일 동안 배양하였다. 배양 7 및 14일 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기로 분석하였다. 측정 결과 연골 분화 마커인 aggrecan, COL1A1, COL2A1, COL10A1는 7 및 14 일에 PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에서 발현되지 않았다. 이것을 미루어 보아 PCL 스캐폴드 및 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드에서는 연골분화 발현에 효과가 없는 것으로 확인 되었다.



[도 8] PCL 스캐폴드, Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 7 및 14 일 동안 배양하여 연골분화 유도 확인을 실시한 연쇄중합반응기기 확인 결과

12. 유전자 발현을 통한 근육 분화 마커 확인

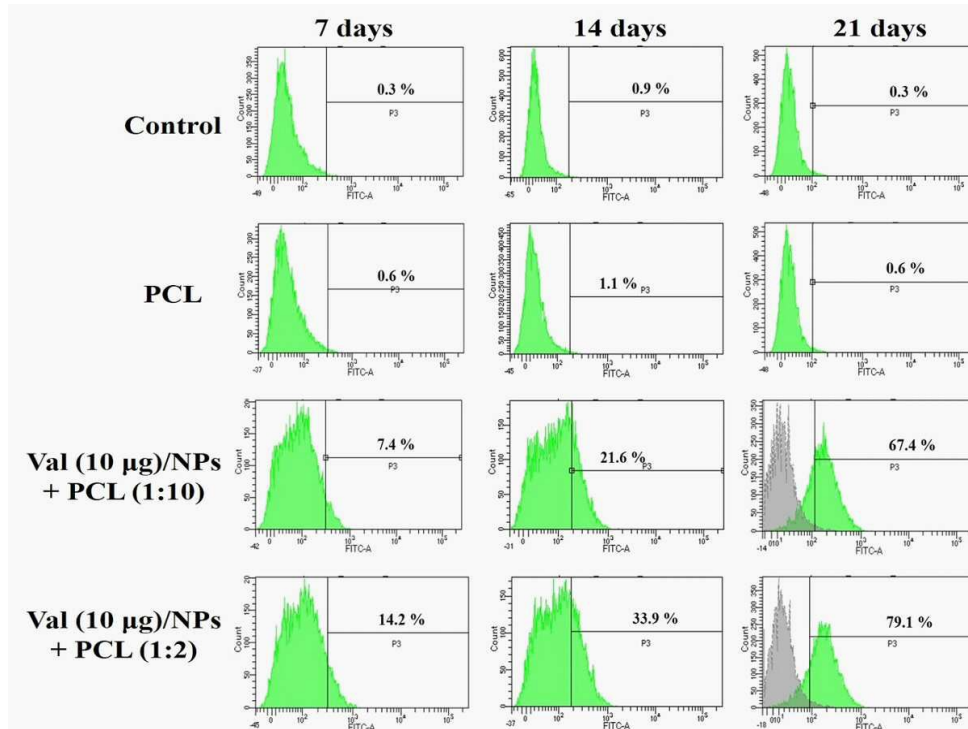
PCL 스캐폴드, Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)]이용하여 7 및 14 일 동안 배양하였다. 배양 7 및 14일 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, Trizol 시약 용액과 chloroform을 세포에 넣었다. 세포를 분리시키기 위해 원심분리를 하였고 상층액을 분리하여 Isopropanol과 혼합하여 RNA를 측정할 침전물을 원심분리를 통하여 얻어낸다. 그 후 DEPC water를 이용하여 NanoDrop 260/280 nm에서 RNA 농도를 측정하였다. 분리된 RNA는 Accupower RT-PCR PreMix를 이용하여 cDNA 합성 및 실시간 중합효소 연쇄반응기기로 분석하였다. 분석 결과 근육 분화 마커인 Myf4, myf5, myoD, myogenin는 PCL 스캐폴드, Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에서 7 및 14 일 동안 전혀 발현되지 않았다. 이것을 미루어 보아 PCL 스캐폴드 및 Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드에서는 근육분화 발현에 효과가 없는 것으로 확인 되었다.



[도 8] PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 1×10^6 으로 분주 후, 7 및 14 일 동안 배양하여 근육분화 유도 확인을 실시한 연쇄중합반응기기 확인 결과

13. 유세포분석기(FACS)를 이용하여 유도만능줄기세포(IPSCs) 분석

PCL 스캐폴드, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 5×10^6 으로 분주 후, 세포배양액[완전배지, complete media: 10% FBS (Fetal bovine serum, GIBCO), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (GIBCO) 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO)]이용하여 7, 14 및 21 일 동안 배양하였다. 배양 7, 14 및 21일 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 스캐폴드로부터 세포를 조심스럽게 떼어낸다. 세포에 유도만능줄기세포(IPSCs) 마커인 TRA-1-60 마커를 5 μl 넣고 상온에서 5분간 반응을 한다. 반응 후 magnetic 나노입자를 첨가하여 상온에서 10분간 반응을 한다. 반응 후 특수 자석을 이용하여 TRA-1-60 마커가 표지된 세포만을 얻어서 유세포분석기(FACS)를 이용하여 분석한다. 분석 결과 Control과 PCL 스캐폴드는 시간이 지남에 따라 유도만능줄기세포 유도가 없는 반면 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에서는 유도만능줄기세포(IPSCs) 마커(TRA-1-60)가 반응을 하였고 또한, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 분주된 지방유래줄기세포는 시간이 지날수록 다른 그룹보다 높은 수치를 나타냈다. 따라서, Val (10 μg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드는 유도만능줄기세포 유도하는데 좋은 조건을 제공하는 것이다.



[도 9] PCL 스캐폴드, Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.1 : 1 = 1:10) 그리고 Val (10 µg)이 탑재된 생분해성 나노입자 + PCL 스캐폴드 (0.5 : 1 = 1:2)에 지방유래줄기세포를 5×10^6 으로 분주 후, 7, 14, 및 21 일 동안 배양하여 유세포분석기(FACS)를 이용하여 유도만능줄기세포 유도 확인

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.