(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0037900
(43) 공개일자 2023년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) *C12M 1/34* (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01) *C12N 13/00* (2017.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 35/02 (2013.01)
C12M 23/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0121021
(22) 출원일자 2021년09월10일
심사청구일자 2021년09월10일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 RA관 405호
김지운
서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 RA관 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

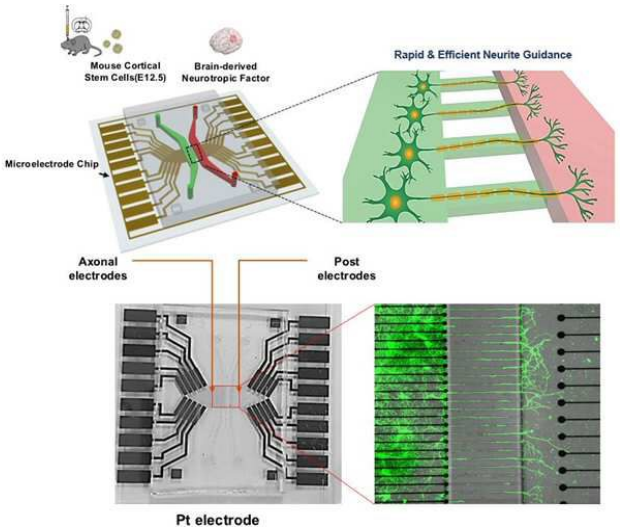
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **신경줄기세포의 효율적인 분화를 위한 미세전극칩 및 이를 이용한 신경재생 방법**

(57) 요 약

본 발명은 신경줄기세포의 효율적인 분화를 위한 미세전극칩 및 이를 이용한 신경재생 방법으로, 더욱 상세하게는, 브릿지 채널을 통해 연결되고 양쪽으로 구획화된 채널을 통해 신경 네트웍이 신경 돌기 형태만으로 분리될 수 있도록 제어할 수 있는 미세전극칩 및 이를 통해 효과적으로 신경세포를 재생시킬 수 있는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 미세전극칩은 뇌의 모듈화된 네트웍에서의 축색 돌기 신호 전달에 관한 연구 및 향후 신경재생 후보물질의 스크리닝을 위한 플랫폼으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12M 41/46 (2013.01)
C12N 13/00 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 2506/08 (2013.01)
(72) 발명자
최윤영
서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 RA관 405호
이희욱
서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 RA관 405호
하장호
서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 RA관 405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711110045
과제번호 2019R1A2C2008863
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구지원사업
연구과제명 다기능성 나노입자 및 3차원 마이크로칩 시스템을 이용한 신경재생 연구
기 여 율 40/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711139190
과제번호 CSM2105M101
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 나노종합기술원
연구사업명 한국과학기술원부설나노종합기술원지원(R&D)
연구과제명 넥스트 웨이브 (포스트 코로나) 대응 언컨택트 디지털 PCR 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345333317
과제번호 2021R1I1A1A01055640
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 프린팅 공정 기반의 전압 조절 가능한 롤러블 아연-이온 이차전지 모듈 시스템 기술 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

미세전극 및 전극 패드를 포함하는 기판; 및

상기 기판의 상측에 배치되는 미세유체채널부를 포함하고,

상기 미세유체채널부는,

제1채널, 상기 제1채널에 대향되도록 배치되는 제2채널, 및 상기 제1채널과 상기 제2채널 사이에 배치되고 상기 제1채널과 상기 제2채널을 연결하는 브릿지 채널을 하나 이상 포함하는 것인, 미세전극칩.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기판은:

상기 기판의 일측에 배치되고, 하나 이상의 제1전극패드를 포함하는 제1전극패드부;

상기 기판의 타측에 배치되고, 하나 이상의 제2전극패드를 포함하는 제2전극패드부;

상기 하나 이상의 제1전극패드부 전기적으로 연결되는 제1미세전극을 하나 이상 포함하는 제1전극부; 및

상기 하나 이상의 제2전극패드부와 전기적으로 연결되고 상기 제1미세전극과 대향되도록 배치되는 제2미세전극을 하나 이상 포함하는 제2전극부;를 포함하는 것인, 미세전극칩.

청구항 3

제2항에 있어서, 하나 이상의 상기 브릿지 채널은 하나 이상의 상기 제1미세전극과 각각 동일한 축 상에 놓이도록 배치되는 것인, 미세전극칩.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 제1미세전극의 말단부 및 상기 제2미세전극의 말단부는 원형인 것인, 미세전극칩.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1미세전극부의 말단부의 직경은 상기 제2미세전극의 말단부의 직경보다 작은 것인, 미세전극칩.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 하나 이상의 제1미세전극의 말단부는 각각 대응되는 브릿지 채널 단부의 상측에 배치되는 것인, 미세전극칩.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 제1미세전극의 말단부 직경은 25 내지 35 um인 것인, 미세전극칩.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 제2미세전극의 말단부 직경은 40 내지 60 um인 것인, 미세전극칩.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 제1채널은 제1주입부 및 제1배출부를 포함하고, 상기 제2채널은 제2주입부 및 제2배출부를 포함하는 것인, 미세전극칩.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 미세전극 및 전극 패드는 금 (Au)을 포함하는 것인, 미세전극칩.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 미세유체채널부는 폴리디메틸실록산 (Polydimethylsiloxane; PDMS)를 포함하는 것인, 미세 전극칩.

청구항 12

다음 단계를 포함하는 신경세포의 재생 방법:

신경세포를 포함하는 시료를 하측에 미세전극이 배치된 채널 내부에 투입하는 투입 단계; 및

상기 채널에 전극을 통해 전기적 자극을 가해주어 상기 채널과 연결된 브릿지 채널 내부를 따라 축색돌기의 성장을 유도하는 배양 단계.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 배양 단계는 배양액을 공급해주는 공급 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 방법은 광학 장비를 통해 배양된 신경세포의 분화정도를 확인하는 이미징 단계를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 배양 단계는 상기 브릿지 채널과 동일 축 상에 배치된 상기 미세전극을 통해 전기적 자극을 가해주는 전류 인가 단계를 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포의 효율적인 분화를 위한 미세전극칩 및 이를 이용한 신경재생 방법으로, 더욱 상세하게는, 브릿지 채널을 통해 연결되고 양쪽으로 구획화된 채널을 통해 신경 네트웍이 신경 돌기 형태만으로 분리될 수 있도록 제어할 수 있는 미세전극칩 및 이를 통해 효과적으로 신경세포를 재생시킬 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재까지 신경세포가 손상되어 나타나는 퇴행성 신경질환의 치료를 위해 신경세포 분화유도를 이용한 신경재생 연구들이 진행되어 왔다. 하지만, 종래 연구에서는 중추신경계 (Central nervous system; CNS)에 손상이 가해지면 신경세포내의 축색돌기 (Axon) 성장이 크게 억제되어 신경재생 및 신경네트웍 형성이 제한된다는 한계점이 존재하였다. 또한, 실제 신경 네트웍 내에서는 신경세포 체내 환경의 복잡성이 존재하며 이들을 제어하고 분석하는데 있어 기술적인 제약이 있다. 이러한 문제점 해결을 위해서는 신경세포를 구획화된 공간 내에 고립시켜 배양하여야 하며, 주위 신경세포군으로부터의 영향을 제어하여야 한다. 또한 신경세포 주변 미세환경(microenvironment)의 정밀한 조절, 축색돌기(Axon)의 선택적인 성장을 할 수 있는 특정조건이 요구된다.

[0003] 이에 따라, 종래의 연구결과에서 신경세포의 효율적인 분화유도가 가능하며 손상된 신경을 회복시키기 위해 레티노산 (Retinoic acid; RA)과 같은 화학적 유도 방법이 많이 사용되었다. 그러나, 이러한 방법은 화학물질이 가진 독성으로 인한 세포의 사멸을 야기할 수 있으며 생존세포 중 극히 일부만이 신경 세포 고유의 마커를 발현(50~70%)한다는 단점이 존재하였다. 또한, 신경세포 주위의 수많은 돌기들이 존재하여 실제 신경 네트웍을 구현하기 어렵다는 문제점이 있었다.

[0004] 이러한 배경에서 신경세포에 화학적 손상을 가하지 않고 신경세포를 고립시켜 배양할 수 있고, 이를 통해 신경세포의 주변의 환경과 축색돌기의 선택적인 성장을 할 수 있는 장치 및 이를 통한 신경세포의 재생방법에 대한 수요가 높아지고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 브릿지 채널을 통해 연결되고 양쪽으로 구획화된 채널을 통해 신경 네트웍이 신경 돌기 형태만으로 분리될 수 있도록 제어할 수 있는 미세전극칩을 제작하였고, 본 발명에 따른 미세전극칩을 이용한 신경세포 재생 방법이 월등히 우수한 것을 확인하였다.

[0006] 이에, 본 발명의 목적은 신경줄기세포의 효율적인 분화를 위한 미세전극칩을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 신경세포의 재생 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 신경재생 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 미세전극칩의 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 본 발명은 신경줄기세포의 효율적인 분화를 위한 미세전극칩 및 이를 이용한 신경재생 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 미세 전극칩은 구획화된 채널과 브릿지 채널을 통하여 원하는 방향으로의 신경 네트웍을 제어할 수 있고, 이를 통해 신경세포의 효율적인 분화를 유도할 수 있다.

[0011] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0013] 본 발명의 일 양태는, 미세전극 및 전극 패드를 포함하는 기판; 및 기판의 상측에 배치되는 미세유체채널부를 포함하고, 미세유체채널부는, 제1채널, 제1채널에 대향되도록 배치되는 제2채널, 및 제1채널과 제2채널 사이에 배치되고 제1채널과 제2채널을 연결하는 브릿지 채널을 하나 이상 포함하는 것인, 미세전극칩이다.

[0014] 본 명세서 상의 용어 "미세유체채널부"는 수십 내지 수백 마이크로미터 영역의 크기를 가진 미세유로를 사용하여 신경세포를 포함하는 시료가 주입되어 배양액 및 전기적 자극에 의해 신경세포가 재생되는 공간으로서 역할할 수 있다. 본 명세서 상에서 미세유체채널부는 미세유체 시스템 또는 마이크로플루이딕 시스템 (microfluidic system) 용어로 상호 교차 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에서, 미세유체채널부는 브릿지 채널을 10 내지 110개, 20 내지 100개, 30 내지 90개, 40 내지 80개, 50 내지 70개, 예를 들어, 60개 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에서, 하나 이상의 브릿지 채널 사이의 간격은 10 내지 90um, 20 내지 80um, 30 내지 70um, 40 내지 60um, 10 내지 80um, 10 내지 70um, 10 내지 60um, 20 내지 90um, 30 내지 90um, 40 내지 90um, 50 내지 90um, 예를 들어, 50 um일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에서, 브릿지 채널의 길이는 200 내지 800 um, 300 내지 800 um, 400 내지 800 um, 200 내지 700 um, 200 내지 600 um, 200 내지 500 um, 300 내지 700 um, 400 내지 600 um, 450 내지 550 um 또는 500um인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에서, 브릿지 채널의 폭 및 높이는 1 내지 20 um, 1 내지 18 um, 1 내지 16 um, 1 내지 14 um, 1 내지 12 um, 1 내지 10 um, 3 내지 20 um, 5 내지 20 um, 7 내지 20 um, 9 내지 20 um, 3 내지 18 um, 5 내지 16 um, 7 내지 14 um, 9 내지 12 um, 9 내지 11 um 또는 10 um인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에 있어서 브릿지 채널은 미세유채채널부의 제1채널 및 제2채널 사이에 배치되고, 짧은 넓이와 낮은 폭과 높이를 가짐에 따라 제1채널 또는 제2채널에서 재생되는 신경세포의 축색 돌기 (Axon)이 브릿지 채널을 따라 재생될 수 있도록 유도할 수 있다. 따라서, 축색 돌기가 브릿지 채널을 따라 성장하게 되고 이를 통해 사용자는 미세전극칩에서 신경세포를 원하는 위치에 고립시킬 수 있어, 재생된 신경세포의 신경 네트웍을 축색 돌기 (Axon)의 형태만으로 연결하여 신경 네트웍을 원하는 형태로 구획화하고 제어할 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서 미세전극은 전극패드로부터 공급받은 전류를 미세유체채널부를 향해 전달할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서 미세전극은 미세유체채널부가 배치되는 하측에 배치되어 신경세포가 주입되는 미세유체채널부의 제1채널 또는 제2채널을 향해 전기적 자극을 가해줄 수 있다.

[0021] 본 명세서 상의 용어, "축색"은 신경세포의 축색소구에서 나오는 돌기상의가늘고 긴 신경섬유이며, 원형질의 축삭형질을 중심으로, 쉬반 세포 (Schwann's cell)로 이루어지는 나선상의 신경초가 그 주위를 둘러싸는 구조를 이루고 있다. 축색은 신경세포에서 일어난 활동전위를 주변의 말초에 전달한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에서, 기판은 하나 이상의 전극패드를 포함하는 전극패드부, 및 전극패드부와 전기적으로 연결되는 미세전극을 하나 이상 포함하는 전극부를 하나 이상으로 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 전극 패드 및 미세 전극은 기판 상에 패터닝을 통해 배치될 수 있다.

[0024] 구체적으로, 본 발명에 있어서 기판은 기판의 일측에 배치되고, 하나 이상의 제1전극패드를 포함하는 제1전극패드부; 기판의 타측에 배치되고, 하나 이상의 제2전극패드를 포함하는 제2전극패드부; 하나 이상의 제1전극패드부 전기적으로 연결되는 제1미세전극을 하나 이상 포함하는 제1전극부; 및 하나 이상의 제2전극패드부와 전기적으로 연결되고 제1미세전극과 대향되도록 배치되는 제2미세전극을 하나 이상 포함하는 제2전극부;를 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에서, 기판은 전극패드부 및 미세전극을 전기적으로 연결하는 전극선을 포함할 수 있다. 전극선은 기판 상에 패터닝을 통해 배치될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 구현예에서, 제1전극패드부는 제1전극패드 및 제1미세전극과 전기적으로 연결되는 제1전극선을 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에서, 제2전극패드부는 제2전극패드 및 제2미세전극과 전기적으로 연결되는 제2전극선을 포함하는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에서, 기판은 제1미세전극을 10 내지 110개, 20 내지 100개, 30 내지 90개, 40 내지 80개, 50 내지 70개, 예를 들어, 60개 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에서, 기판은 제2미세전극을 10 내지 110개, 20 내지 100개, 30 내지 90개, 40 내지 80개, 50 내지 70개, 예를 들어, 60개 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에서, 복수의 미세전극이 하나의 전극선과 전기적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 2 내지 10, 3 내지 10, 4 내지 10, 5 내지 10, 6 내지 10, 2 내지 9, 3 내지 7, 4 내지 6, 1 내지 30, 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 20 내지 30, 1 내지 25, 1 내지 20 또는 1 내지 15 개의 미세전극이 하나의 전극선과 전기적으로 연결될 수 있다. 따라서, 복수의 미세전극은 다채널 전극 어레이를 형성할 수 있으며, 미세전극 6개 당 하나의 전극선과 연결되는 경우 6개의 다채널 전극 어레이 형성을 통해 전극 기판위에서 신경세포가 네트워크를 형성하면서 발생하는 전기 및 생리학적인 변화에 대한 관찰이 가능하다.

[0031] 본 발명에 있어서, 하나 이상의 브릿지 채널은 하나 이상의 제1미세전극과 각각 동일한 축 상에 놓이도록 배치되는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에서, 제1미세전극의 말단부는 별, 원형, 반원형, 정사각형, 직사각형, 삼각형 및 피라미드형으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나의 형상인 것일 수 있고, 예를 들어, 원형일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에서, 제2미세전극의 말단부는 별, 원형, 반원형, 정사각형, 직사각형, 삼각형 및 피라미드형으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나의 형상인 것일 수 있고, 예를 들어, 원형일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에서, 제1미세전극의 말단부 및 제2미세전극의 말단부는 별, 원형, 반원형, 정사각형, 직사각형, 삼각형 및 피라미드형으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나의 형상인 것일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 구현에에서, 제1미세전극부의 말단부 직경은 제2미세전극의 말단부의 직경보다 작은 것일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에서, 하나 이상의 제1미세전극의 말단부는 각각 대응되는 브릿지 채널 단부의 상측에 배치될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에서, 제1미세전극의 말단부 직경은 10 내지 60 um, 10 내지 55 um, 10 내지 50 um, 10 내지 45 um, 10 내지 40 um, 10 내지 35 um, 15 내지 60 um, 20 내지 60 um, 25 내지 60 um, 30 내지 60 um, 35

내지 60 um, 15 내지 55 um, 20 내지 40 um 또는 25 내지 35 um 인 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에서, 제2미세전극의 말단부 직경은 30 내지 80 um, 30 내지 75 um, 30 내지 70 um, 30 내지 65 um, 30 내지 60 um, 30 내지 55 um, 35 내지 80 um, 35 내지 80 um, 40 내지 80 um, 45 내지 80 um, 50 내지 80 um, 35 내지 75 um, 40 내지 60um 또는 45 내지 55 um 인 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에서, 제1채널은 제1주입부 및 제1배출부를 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에서, 제2채널은 제2주입부 및 제2배출부를 포함하는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에서, 미세전극 및 전극 패드는 금 (Au)을 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명에 있어서 미세유체채널부는 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS), 폴리락틱산 (polylactic acid, PLA), 폴리글리콜산 (polyglycolic acid; PGA), 폴리디옥사논 (polydioxanone; PDO)으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나를 포함할 수 있다. 다른 예로서, 광학적으로 투명하고, 내구성이 강하며, 생물 친화적이고, 유연하여, motion-tracking이라는 광학적 방법을 이용하여 신경세포의 상태를 용이하게 분석할 수 있는 PDMS 등이 될 수 있다.

[0043] 본 발명의 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 신경세포의 재생 방법이다:

[0044] 신경세포를 포함하는 시료를 하측에 미세전극이 배치된 채널 내부에 투입하는 투입 단계; 및

[0045] 채널에 전극을 통해 전기적 자극을 가해주어 채널과 연결된 브릿지 채널 내부를 따라 축색돌기의 성장을 유도하는 배양 단계.

[0046] 본 발명에 따른 투입 단계에서 사용자는 브릿지 채널에 가까운 영역에 신경세포를 투입할 수 있다. 그리고, 신경세포가 투입 단계에서 브릿지 채널에 가깝게 배치되면 배양 단계에서 전기적 자극을 받음에 따라 축색 돌기가 브릿지 채널 사이로 성장하게 되며, 신경세포가 지속적으로 브릿지 채널을 따라 성장하게 되면서 각각의 신경세포의 축색돌기가 브릿지 채널에 의해 고정 또는 격리될 수 있다. 이때, 브릿지 채널은 특정 간격을 유지하면서 배치되기 때문에 성장한 신경세포도 서로 특정 간격을 유지하면서 자라게 되고, 이를 통해 사용자는 원하는 방향으로의 신경 네트웍을 제어할 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 구현예에서, 배양 단계는 배양액을 공급해주는 공급 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서 배양액은 신경영양인자를 포함할 수 있고, 배양액은 뇌유래-신경영양인자 또는 아교 세포 유래 신경영양인자를 포함할 수 있고, 예를 들어, 신경영양인자는 BDNF, GDNF를 포할 수 있다.

[0049] 또한 본 발명에 있어서 배양액은, 효율적인 신경세포로의 분화유도를 위해 외인성 인자인 소닉 헤지호그 (Sonic hedgehog)를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 구현예에서, 배양액은 1 내지 40, 1 내지 35, 1 내지 30, 1 내지 35, 1 내지 30, 1 내지 25, 1 내지 20, 5 내지 40, 10 내지 40, 15 내지 40, 20 내지 40, 5 내지 35, 10 내지 30, 15 내지 25, 또는 25 mg/mL 농도의 신경영양인자를 포함하는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 구현예에서, 배양 단계는 7일간 수행되는 것일 수 있다.

[0052] 본 명세서 상의 용어 "뇌유래-신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)" 단백질은 뇌에 가장 풍부하게 분포되어 있는 뉴로트로핀(neurotrophin)이다. 이는 신경원(neuron)의 성장을 촉진하고, 신경전달물질의 합성, 대사, 유리 및 신경원의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한, BDNF 단백질은 우울증 환자의 전두엽 피질 또는 해마에서 감소되고, 이의 농도를 증가시켜 우울증을 치료할 수 있음이 알려져 있다.

[0053] 본 명세서 상의 용어 "아교 세포 유래 신경영양인자 (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor, GDNF)"는 많은 종류의 뉴런의 생존을 강력하게 촉진하는 작은 단백질로, GFRα 수용체, 특히 GFRα1을 통해 신호를 보낸다. 또한, "신경 성장인자(nerve growth factor, NGF)"는 특정 표적 뉴런의 성장, 유지, 증식 및 생존의 조절에 주로 관여하는 신경영양인자이다.

[0054] 본 발명의 일 구현예에서, 방법은 광학 장비를 통해 배양된 신경세포의 분화정도를 확인하는 이미징 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명의 일 구현예에서, 이미징 단계는 공초점 현미경을 이용한 이미징 방법을 사용하는 것일 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 구현예에서, 배양 단계는 브릿지 채널과 동일 축 상에 배치된 미세전극을 통해 전기적 자극을 가

해주는 전류 인가 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 구현에서, 전류 인가 단계는 80 내지 120, 90 내지 120, 95 내지 120, 100 내지 120, 80 내지 115, 80 내지 110, 80 내지 105, 80 내지 100, 90 내지 110, 95 내지 105 또는 100HZ의 주파수로 전기적 자극을 가하는 것일 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 구현예에서, 전류 인가 단계는 10 내지 40, 15 내지 40, 20 내지 40, 25 내지 40, 10 내지 35, 10 내지 30, 10 내지 25, 15 내지 35, 20 내지 30 또는 25 mV의 전압으로 전기적 자극을 가해 주는 것일 수 있다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 신경재생 후보물질의 스크리닝 방법이다:

[0060] 하측에 미세전극이 배치되고 신경세포가 투입된 채널 내부에 후보물질을 투입하는 투입 단계;

[0061] 채널에 전극을 통해 전기적 자극을 가해주어 채널과 연결된 브릿지 채널 내부를 따라 축색돌기의 성장을 유도하는 배양 단계; 및

[0062] 신경세포의 재생 정도를 평가하는 평가 단계.

[0063] 본 명세서 상의 용어, "후보 물질"은 신경세포의 재생에 있어서 효과가 있다고 판단되는 약물 또는 신경세포의 재생 효과가 있을 것으로 예상되는 약물을 의미한다.

[0064] 본 명세서 상의 용어, "평가"는 신경세포의 재생 여부, 재생 정도 또는 신경세포의 성장성을 확인하는 것으로, 본 발명의 목적상, 신경세포 재생의 평가는 재생된 신경세포의 길이, 구체적으로, 신경 돌기 (Neurite)의 길이로 신경의 재생 정도를 평가하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0065] 본 발명은 신경줄기세포의 효율적인 분화를 위한 미세전극칩 및 이를 이용한 신경재생 방법으로, 더욱 상세하게는, 브릿지 채널을 통해 연결되고 양쪽으로 구획화된 채널을 통해 신경 네트웍이 신경 돌기 형태만으로 분리될 수 있도록 제어할 수 있는 미세전극칩 및 이를 통해 효과적으로 신경세포를 재생시킬 수 있는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 미세전극칩은 뇌의 모듈화된 네트웍에서의 축색 돌기 신호 전달에 관한 연구 및 향후 신경재생 후보물질의 스크리닝을 위한 플랫폼으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩의 개념도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩의 사시도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩의 브릿지 채널을 확대하여 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩 내의 전압과 전류 영향을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩 내의 주파수와 저항의 영향을 분석한 그래프이다.

도 6은 플레이트 (plate)에서 신경영양인자 및 전기자극 조건에 따라 분화한 신경줄기세포를 공초점 현미경을 통해 관찰한 결과를 나타낸 사진이다 (스케일 바 크기: 100 um).

도 7는 플레이트에서 신경영양인자 및 전기자극 조건에 따라 분화한 신경줄기세포의 신경세포 및 교질세포의 마커를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩에서 신경영양인자 및 전기자극 조건에 따라 분화시킨 신경줄기세포를 공초점 현미경을 통해 관찰한 결과를 나타낸 사진이다 (스케일 바 크기: 100 um).

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩에서 배양한 신경세포의 조건별 신경돌기의 평균 길이를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩에서 신경영양인자 및 전기자극 조건에 따라 분화한 신경줄기세포의 신경세포 및 교질세포의 마커를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩을 통해 손상된 신경줄기세포를 신경영양인자 및 전기적 자극 없이 배양하여 재생효과를 확인한 결과를 나타낸 사진이다 (스케일 바 크기: 50 um).

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩을 통해 손상된 신경줄기세포를 신경영양인자 및 전기적 자극을 가해 신경세포를 배양하여 재생효과를 확인한 결과를 나타낸 사진이다 (스케일 바 크기: 50 um).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 본 발명의 바람직한 실시 예의 상세한 설명은 첨부된 도면들을 참조하여 설명할 것이다. 하기에서 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다.

[0068] 본 발명의 개념에 따른 실시 예는 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있으므로 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 본 명세서 또는 출원에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명의 개념에 따른 실시 예를 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0069] 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "연결되어" 있다거나 "접속되어" 있다고 언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.

[0070] 반면에, 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "직접 연결되어" 있다거나 "직접 접속되어" 있다고 언급된 때에는, 중간에 다른 구성요소가 존재하지 않는 것으로 이해되어야 할 것이다. 구성요소들 간의 관계를 설명하는 다른 표현들, 즉 "~사이에"와 "바로 ~사이에" 또는 "~에 이웃하는"과 "~에 직접 이웃하는" 등도 마찬가지로 해석되어야 한다.

[0072] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩의 사시도이고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세전극칩의 브릿지 채널을 확대하여 나타낸 도면이다.

[0073] 도 2를 참조하면, 일 실시예에 따른 미세전극칩(1000)은 기판(100) 및 미세유체채널부(200)를 포함할 수 있다.

[0074] 기판(100)은 제1전극패드부(110), 제2전극패드부(120), 제1전극부(130) 및 제2전극부(140)를 포함할 수 있다.

[0075] 제1전극패드부(110)는 기판(100)의 일측에 배치될 수 있다. 제1전극패드부(110)는 하나 이상의 제1전극패드(115)를 포함할 수 있다. 제1전극패드(115)는 제1전극선(117)과 각각 연결될 수 있고, 이에 따라, 제1전극패드(115)는 외부로부터 전류를 받아 제1전극선(117) 및 제1미세전극(135)을 향해 전류를 공급해줄 수 있다.

[0076] 제1전극패드(115)는 금 (Au)을 포함할 수 있다.

[0077] 제2전극패드부(120)는 기판(100)의 타측에 배치될 수 있다. 제2전극패드(125)는 기판(100)의 타측에 배치되어 기판(100) 상에서 제1전극패드(115)와 대향하도록 배치될 수 있다. 제2전극패드(125)는 제2전극선(127)과 연결될 수 있고, 이에 외부로부터 공급받은 전류를 제2전극패드(125)는 전류를 제2전극선(127) 및 제2미세전극(145)을 향해 공급해줄 수 있다.

[0078] 복수의 미세전극(135, 145)은 하나의 전극선(117, 127)과 전기적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 2 내지 10, 3 내지 10, 4 내지 10, 5 내지 10, 6 내지 10, 2 내지 9, 3 내지 7, 4 내지 6, 1 내지 30, 5 내지 30, 10 내지 30, 15 내지 30, 20 내지 30, 1 내지 25, 1 내지 20, 1 내지 15 또는 1 내지 10개의 미세전극이 하나의 전극선과 전기적으로 연결될 수 있다.

[0079] 제2전극패드(125)는 금 (Au)을 포함할 수 있다.

[0080] 제1전극부(130)는 기판(100)의 중심부에 배치될 수 있고, 제1전극패드부(110)와 전기적으로 연결되는 제1미세전극(135)을 하나 이상 포함할 수 있다.

[0081] 제1미세전극(135)에는 제1전극패드부(110)의 제1전극패드(115)에서 공급된 전류가 흐를 수 있고, 이에 따라, 제1미세전극(135)의 상측에 배치된 제1채널(210) 내부의 신경세포에 전기적 자극이 가해질 수 있다.

[0082] 제2전극부(140)는 기판(100)의 중심부에 배치될 수 있고, 제2전극패드부(120)와 전기적으로 연결되는 제2미세전극(145)을 하나 이상 포함할 수 있다.

[0083] 제2미세전극(145)은 제1미세전극(135)과 대향되도록 배치될 수 있다. 이때, 제1전극패드(115) 및 제2전극패드(125)에는 서로 다른 극이 연결될 수 있고, 이에 따라, 제1미세전극(135) 및 제2미세전극(145) 사이에서 전류가

한 방향으로 흐를 수 있다. 구체적으로, 제1전극패드(115)에 양극(+)가 연결되고 제2전극패드(125)에 음극(-)이 연결되는 경우, 제1미세전극(135)에서 제2미세전극(145) 방향으로 전류가 일정하게 흐를 수 있다. 반대로, 제1전극패드(115)에 음극(-)가 연결되고 제2전극패드(125)에 양극(+)가 연결되는 경우, 제2미세전극(145)에서 제1미세전극(135) 방향을 전류가 일정하게 흐를 수 있다. 그리고, 제1미세전극(135)과 제2미세전극(145) 사이의 상측에는 브릿지 채널(230)이 배치될 수 있고, 제1미세전극(135)과 제2미세전극(145) 사이에서 전류가 일정한 방향으로 흐르는 경우 브릿지 채널(230)은 한 방향으로 흐르는 전류에 의해 전기적 자극이 가해지게 된다. 브릿지 채널(230)에 한 방향으로 흐르는 전류가 영향을 미치게 되면 신경세포의 축색 돌기가 브릿지 채널(230)을 따라 성장 또는 재생되는 것이 더욱 용이하며, 이를 통해 신경세포의 재생과정을 촉진할 수 있다.

[0084] 제2미세전극(145)에는 제2전극패드부(120)의 제2전극패드(125)에서 공급된 전류가 흐를 수 있고, 이에 따라, 제2미세전극(145)의 상측에 배치된 제2채널(220) 내부에 전기적 자극을 가할 수 있다.

[0085] 제1미세전극의 말단부(136) 및/또는 제2미세전극의 말단부(146)는 별, 원형, 반원형, 정사각형, 직사각형, 삼각형 및 피라미드형으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나의 형상인 것일 수 있고, 도 3과 같이 원형일 수 있다.

[0086] 제1미세전극의 말단부(136) 직경은 제2미세전극의 말단부(146) 직경보다 작을 수 있다. 제1미세전극(135)의 경우 신경세포가 배치되는 제1채널(210)의 하측에 배치되고, 제2미세전극(145)의 경우 초기에는 신경세포가 배치되지 않고 신경세포가 재생됨에 따라 성장된 신경세포가 배치되게 된다. 따라서, 초기에 신경세포에 세밀한 전기적 자극을 가하기 위하여 제1미세전극의 말단부(136) 직경은 제2미세전극의 말단부(146) 직경보다 작게 설계될 수 있다.

[0087] 제1미세전극의 말단부(136) 직경은 10 내지 60 um, 10 내지 55 um, 10 내지 50 um, 10 내지 45 um, 10 내지 40 um, 10 내지 35 um, 15 내지 60 um, 20 내지 60 um, 25 내지 60 um, 30 내지 60 um, 35 내지 60 um, 15 내지 55 um, 20 내지 40 um 또는 25 내지 35 um 일 수 있다.

[0088] 제2미세전극의 말단부(146) 직경은 30 내지 80 um, 30 내지 75 um, 30 내지 70 um, 30 내지 65 um, 30 내지 60 um, 30 내지 55 um, 35 내지 80 um, 35 내지 80 um, 40 내지 80 um, 45 내지 80 um, 50 내지 80 um, 35 내지 75 um, 40 내지 60um 또는 45 내지 55 um 일 수 있다.

[0089] 미세유체채널부(200)는 제1채널(210), 제2채널(220) 및 브릿지 채널(230)을 포함할 수 있다.

[0090] 제1채널(210) 내에는 재생을 위한 신경세포 및 신경영양인자를 포함하는 배양액이 공급될 수 있다.

[0091] 제1채널(210)은 신경세포 및 시료가 공급되는 제1주입부(215) 및 신경세포 및 시료가 배출되는 제1배출부(217)를 포함할 수 있다.

[0092] 제2채널(220)은 신경세포 또는 시료가 공급되는 제2주입부(225) 및 신경세포 또는 시료가 배출되는 제2주입부(227)를 포함할 수 있다.

[0093] 제2채널(220)은 제1채널(210)에 대향되도록 배치될 수 있고, 제1채널(210)과 제2채널(220) 사이에는 브릿지 채널(230)이 배치되어 제1채널(210)과 제2채널(220)을 연결할 수 있다.

[0094] 브릿지 채널(230)은 신경세포가 성장함에 따라 축색이 성장하는 통로로서 기능할 수 있다.

[0095] 브릿지 채널(230)은 신경세포체가 통과하기는 어려운 동시에 축색돌기가 관통하기에 적합한 폭과 높이를 가질 수 있다. 브릿지 채널(230)은 축색돌기의 직경에 대응되는 폭과 높이를 갖도록 설계될 수 있다.

[0096] 따라서, 제1채널(210)에서 신경영양인자 및 전기적 자극을 받아 신경세포가 성장하게되면, 신경세포 중 축색돌기만이 브릿지 채널(230)을 통과할 수 있게 되며 축색돌기가 브릿지 채널(230)을 따라 성장하게 되면서 결과적으로 신경세포는 축색돌기가 배치된 방향을 따라 고정될 수 있다.

[0097] 브릿지 채널(230)은 배양 대상인 신경세포의 축색돌기의 직경에 대응되는 폭 및 높이를 가질 수 있다. 예를 들어, 브릿지 채널(230)의 폭과 높이는 1 내지 20 um, 1 내지 18 um, 1 내지 16 um, 1 내지 14 um, 1 내지 12 um, 1 내지 10 um, 3 내지 20 um, 5 내지 20 um, 7 내지 20 um, 9 내지 20 um, 3 내지 18 um, 5 내지 16 um, 7 내지 14 um, 9 내지 12 um, 9 내지 11 um 또는 10 um일 수 있다.

[0098] 제1채널(210) 및 제2채널(230) 사이에 배치되는 하나 이상의 브릿지 채널(230)은 제1미세전극(135)과 각각 동일한 축 상에 놓이도록 배치될 수 있다. 즉, 도 3의 우측 부분과 같이 제1미세전극(135)이 브릿지 채널(230)과 동일 축 상에 배치되어 제1미세전극의 단부(235) 또한 브릿지 채널(230)과 동일한 축 상에 배치될 수 있다. 이를

통해, 제1미세전극의 단부(235)와 브릿지 채널(230) 사이의 거리는 보다 가깝게 배치될 수 있으며, 하나의 브릿지 채널(230)에 하나의 미세전극이 배치됨에 따라 미세전극을 통해 성장하는 신경세포 및 이의 축색돌기에 효과적으로 전기적 자극을 가할 수 있다.

[0099] 하나 이상의 제1미세전극(135)은 각각 대응되는 브릿지 채널 단부(235)의 상측에 배치될 수 있다. 브릿지 채널(230)에 가깝게 제1미세전극의 말단부(136)가 배치되는 경우 축색돌기의 재생 또는 성장 방향을 제어하기 용이하며, 제1미세전극의 말단부(136)가 브릿지 채널 단부(235)의 상측에 배치되는 경우 신경세포와 미세전극 말단부(136)간의 거리가 최소화될 수 있으며, 이를 통해 더욱 효과적으로 축색돌기의 재생 또는 성장 방향을 제어할 수 있다.

[0100] 제2미세전극의 말단부(146)는 브릿지 채널(230)과 일정 간격을 형성하도록 배치될 수 있다.

[0102] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0104] **실시예 1: 미세전극칩 제작 및 전기화학적 특성 확인**

[0105] **1-1. 미세 전극칩 제작**

[0106] 신경줄기세포의 효율적인 분화 유도를 통해 신경 재생을 구현할 수 있는 미세전극칩을 개발하였다. 미세 전극칩을 개발하기 위해서 MEMS 기술 중 포토리소그래피 (Photolithography) 기술과 E-beam physical vapor deposition 기술을 이용하였다. 먼저, PDMS 몰드를 제작하기 위해서 실리콘 웨이퍼에 포토레지스트를 10 μm 높이로 도포한 후 UV 선을 조사하여 브릿지 패턴을 형성하였다. 추가로 포토레지스트를 150 μm 높이로 도포하여 앞선 과정과 같은 방법으로 구획 패턴을 형성하였다. 이후 패턴이 형성된 실리콘 웨이퍼에 사일런 처리를 진행한 후 PDMS를 부어 고온에 굳혀서 몰드를 형성하였다. 그리고, 미세 전극이 형성된 글라스를 제작하기 위해 소다라임 재질의 투명 글라스에 포토레지스트를 도포한 후 UV 선을 조사하여 조사된 부분을 제거하여 패턴을 형성하였다. 이후 E-beam Evaporator를 이용하여 크롬 및 골드를 각각 5 nm, 50 nm 증착한 후 나머지 부분을 제거하였다. 마지막으로 제작된 PDMS 몰드와 전극 패턴 글라스를 세척한 후 각각의 접착부에 플라즈마 처리를 한 뒤 결합하여 오븐에 5분 넣어두어 미세전극칩을 제작하였다.

[0108] **1-2. 전기화학적 분석**

[0109] 미세전극칩 표면 내에 존재하는 물질(Au)의 전기화학적인 분석을 진행하였다. 전극 표면에서 Au 물질의 어떠한 반응이 일어나고 있는가에 대해 직접적으로 파악하기 위해 전기화학적 워크스테이션 (Electrochemical workstation) 장비를 사용하였다. 미세전극칩의 양 끝 전극패드 부분에 전선을 연결한 후, 장비를 작동하기전 작업전극 (Working electrode)의 전압 (Potential, V)를 -0.6 V 부터 0.6 V까지 임의로 설정하였다. 또한 100 mV s^{-1}의 일정속도로 순환시키면서 총 5일동안 동일한 방법으로 전류를 측정하였다.

[0110] 실험결과, 도 4 내지 5에서 확인할 수 있듯이 신경줄기세포를 미세전극칩에 주입 후 전기자극을 가하게 되었을 때 세포 배양액과 전극칩 표면에 존재하는 Au물질과의 전자전달 반응이 더 활발하게 일어난다는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 임피던스 분석을 통해 100Hz 구간 (Electrode failure)에서 주파수 조건을 최적화하였다. 세포 배양 기간이 증가함에 따라 미세유체 채널내의 저항성이 증가한다는 점을 확인하였다.

[0112] **실시예 2: 플레이트에서의 신경줄기세포의 배양 및 신경세포로의 분화 관찰**

[0113] 플레이트에서 발생 12.5일된 마우스 신경줄기세포의 배양을 위하여 DMEM/F12 (1:1) 배지에 2 %의 B27 supplement와 1%의 N2 supplement를 넣고 배양하였다. 이후, 6-웰 원형 플레이트에 10 ㎍/ml 농도의 폴리-L-오르니틴 (Poly-L-ornithine)과 라미닌 (Laminin)을 포함하는 ECM이 코팅된 커버 글라스를 배치하였다. 그 위에 3일간 배양된 신경구 (Neurosphere)를 3시간 동안 부착시켰다. 이 때, 줄기세포에서 신경세포로의 분화유도를 극대화하기 위해 20 ng/ml 농도의 신경영양인자 GDNF, BDNF와 100 ng/ml 농도의 외인성 인자 소닉 헤지호그

(Sonic hedgehog)를 배양 배지에 추가하였다. 총 7일간 분화를 진행하였으며, 새로운 분화 배지는 하루에 한 번씩 교체해 주었다.

[0114] 6-웰-플레이트 내에 코팅된 커버 글라스를 배치한 후, 뚜껑 부분에 전선을 연결함으로써 신경줄기세포에 전기를 가할 수 있는 전기자극 디바이스를 제작했다. 전기자극 디바이스는 3개의 전극을 결합할 수 있으며, 양 끝에는 (-), 가운데는 (+) 전극을 가할 수 있는 형태로 제작하였다. 이 때, 한 개의 plate 당 분화용 배지를 약 3ml씩 첨가하여 세포 배양 및 분화를 유지하며 전기자극을 가했다. 이 때, 1시간 기준으로 1cm의 면적 당 1V, 1 Hz 세기의 전기자극을 실시했으며 CO_2 인큐베이터에서 분화를 유지하며 총 7일간 관찰하였다.

[0115] 전기자극 후 배양을 유지한 신경줄기세포를 고정용액 4 % 파라포름알데하이드에 15분 동안 담궈 유지했다. 이후, 1 %의 트리톤 (Triton) 용액에 15분, 1 % 소혈청 알부민 (Bovine serum albumin)에 2시간 동안 담군 후 DPBS 용액으로 각 단계마다 2번씩 워싱해주었다. 이 후, 뉴런 및 글라이얼셀의 마커 형광 발현 확인을 위해, 1차 항체 (Purified anti-Tubulin β-3 (TUBB3), GFAP) 부착 작업을 4 ℃에서 하룻동안 실시하였다. 2차 항체 (Alexa fluor 488, 594) 교체 후 2시간동안 대기하였으며 핵 염색을 위해 DAPI 염색을 실시했다. 공초점 현미경을 이용하여 이미지를 얻었으며, Image J 프로그램을 통해 전기자극 및 신경영양인자 처리 조건에 따른 형광 강도를 측정하였으며, 그 결과를 표 1 및 도 6 내지 7에 나타내었다.

표 1

[0116]

	대조군 (No Treatment)	NF (Neurotropic Factor)	ES (Electrical Stimulation)	NF+ES
Tuj1	83.26	99.83	94.08	131.23
GFAP	39.40	17.18	36.15	25.89

[0117] 표 1 및 도 6 내지 7에서 확인할 수 있듯이, 신경줄기세포는 신경영양인자 (NF) 및 전기적 자극이 추가됨에 따라 분화도가 우수해졌으며, 다만 배지에서 배양되는 특성상 신경세포의 축색돌기가 특정한 방향으로 배열되도록 분화되지는 않았다.

[0119] **실시예 3: 미세 전극칩 내에서의 신경줄기세포의 배양 및 신경세포로의 분화 관찰**

[0120] 미세전극칩 내의 구획화된 왼쪽 채널에 E12.5 마우스의 대뇌피질세포에서 박리한 신경줄기세포를 신경구의 형태로 3일간 배양한 상태로 주입하였다. 이 때, 신경세포의 배양은 실시예 2와 동일하게 진행하였다. 구획화된 왼쪽 채널에는 신경영양인자가 포함되지 않은 배지를 20 ul씩 첨가하였으며, 오른쪽 채널에는 신경영양인자가 포함된 배지를 20 ul씩 첨가해줌으로써 세포 배양 및 분화를 유지하며 전기자극을 가하였다. 구체적으로, 실시예 2와 동일한 디바이스를 이용하여 1시간 기준으로 2.5 cm 면적 기준 25 mV, 100 Hz 세기의 전기자극을 실시했으며 신경영양인자 (20 ng/ml)를 같이 처리한 조건에서 CO_2 인큐베이터에서 분화를 유지하며 총 7일간 관찰하였다.

[0121] 전기자극 후 배양을 유지한 신경줄기세포를 고정용액 4 % 파라포름알데하이드에 30분 동안 담궈 유지했다. 이후, 1 %의 트리톤 용액에 30분, 1 % 소혈청 알부민에 4시간 동안 담군 후 DPBS 용액으로 각 단계마다 3번씩 워싱해주었다. 이 후, 뉴런 및 글라이얼셀의 마커 형광 발현 확인을 위해, 1차 항체(Purified anti-Tubulin β-3 (TUBB3), GFAP) 작업을 4° C 에서 하룻동안 실시했다. 2차 항체 (Alexa fluor 488, 594) 교체 후 6시간동안 대기하였으며 핵 염색을 위해 DAPI 염색을 실시했다. 하루 한번 신경영양인자가 포함된 배양액을 교체하며 7일간 배양한 후, 신경세포의 분화를 극대화하기 위해 전기적 자극을 가해주었다. 분리된 축색 돌기(Axon)의 길이와 신경세포 고유의 마커인 Tuj1을 통해 형광발현강도를 측정 후 정량 분석을 진행하였다. 또한, 신경세포의 분화 정도에 대한 구조적인 특성을 확인하기 위해서 공초점 현미경을 이용한 이미징 방법을 통해 확인하였다. 상기 실험결과를 표 2 내지 3 및 도 8 내지 10에 나타내었다.

표 2

[0123]

	대조군 (No Treatment)	NF (Neurotropic Factor)	ES (Electrical Stimulation)	NF+ES
평균 신경돌기 길이 (um)	85.99	193.51	119.81	369.99

표 3

[0124]

	대조군 (No Treatment)	NF (Neurotropic Factor)	ES (Electrical Stimulation)	NF+ES
Tuj1	177.83	93.45	104.68	53.63
GFAP	19.72	36.36	44.35	61.56

[0125] 실험결과, 표 2 내지 3 및 도 8 내지 10에서 확인할 수 있듯이 신경영양인자와 전기적 자극을 같이 처리한 군(370 μm)에서 대조군(194 μm) 대비 신경돌기의 평균 길이가 약 2배 더 길게 측정됨을 확인하였다. 또한, 미세전극칩을 활용한 경우 단순히 플레이트에서 신경줄기세포를 배양한 것에 비해 분화된 신경세포를 일정간격으로 배열할 수 있었으며, 브릿지 채널을 통해 축색 돌기를 성공적으로 분리할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 미세전극칩은 신경줄기세포의 효율적인 분화가 가능한 동시에 원하는 방향으로의 신경망 형성을 구축할 수 있음을 확인하였다.

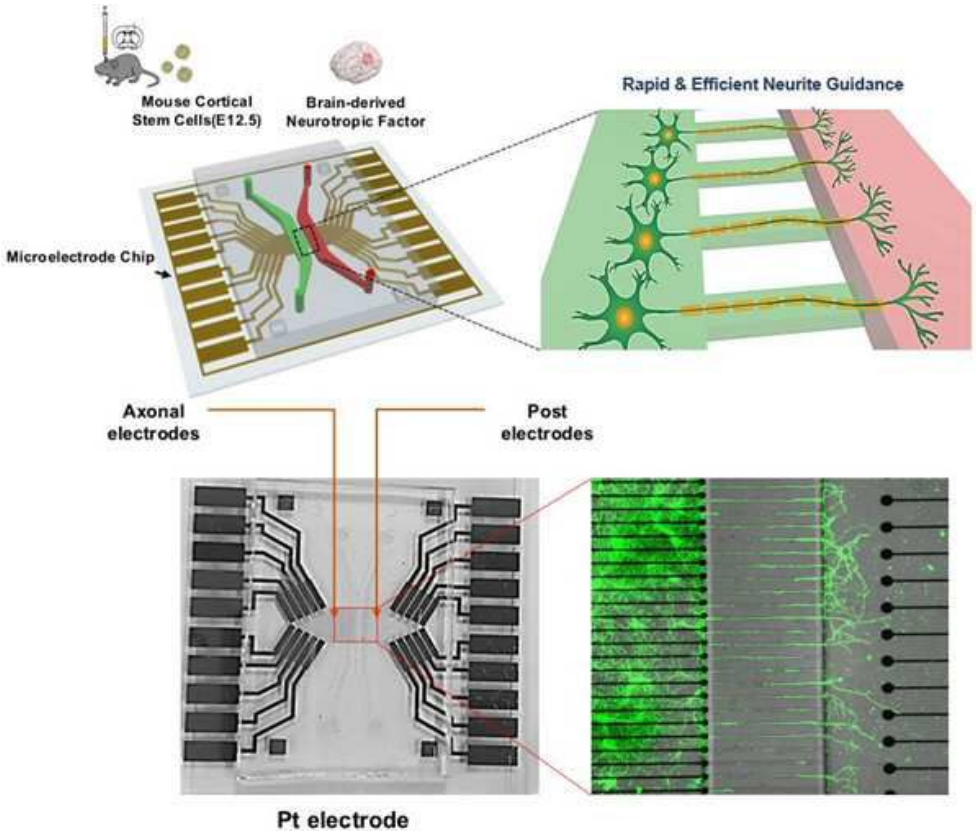
[0127] **실시예 4: 신경 재생 확인**

[0128] 신경 재생 효과를 구현하기 위해 먼저 7일간 축색돌기(Axon)의 성장을 유도하였다. 이후, 석션 펌프를 이용하여 오른쪽 미세유체채널로 분리된 축색돌기(Axon)를 모두 제거하는 물리적인 손상 (Physical injury)을 입혔다. 이후, 3일간 오른쪽 채널에 신경영양인자 20 ng/ml와 전기자극 100 Hz, 25 mv의 최적화된 조건에서 처리를 하여 끊겼던 축색돌기(Axon)를 오른쪽 채널로 다시 분리해 냄으로써 결과적으로 신경 손상이 회복될 수 있도록 하였다. 이 때, 신경 재생의 효과를 비교하기 위해 전기자극 조건 없이 신경영양인자 20 ng/ml 만 처리한 군을 대조군으로 설정하였다. 마지막으로, 이에 대한 면역형광 염색 및 이미징을 실시하였다. 보다 후성숙된 뉴런의 마커인 Tuj1과 신경 섬유 (Neurofilament) 마커를 1차 항체로 이용하여 면역형광염색을 진행하였고 이에 대해 공초점 현미경을 통해 이미징을 실시하였다.

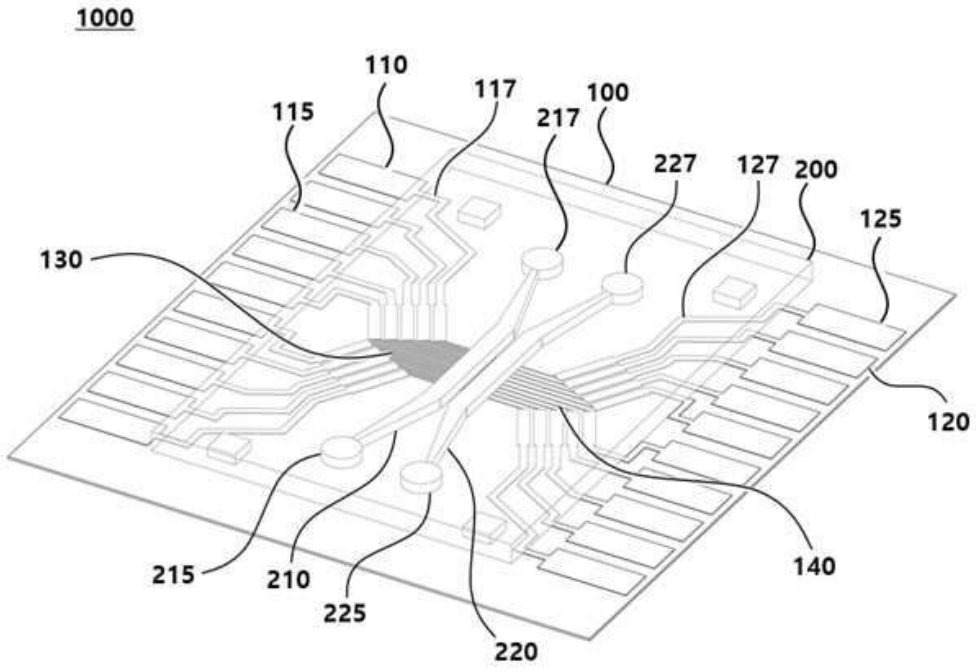
[0129] 실험결과, 도 11 내지 12에서 확인할 수 있듯이 신경영양인자와 전기적 자극을 가한 경우 대조군에 비해 신경세포의 재생이 훨씬 촉진됨을 확인할 수 있었으며, 마찬가지로 브릿지 채널을 통해 축색 돌기를 효과적으로 분리하여 원하는 방향으로의 신경망 형성이 가능함을 확인하였다.

도면

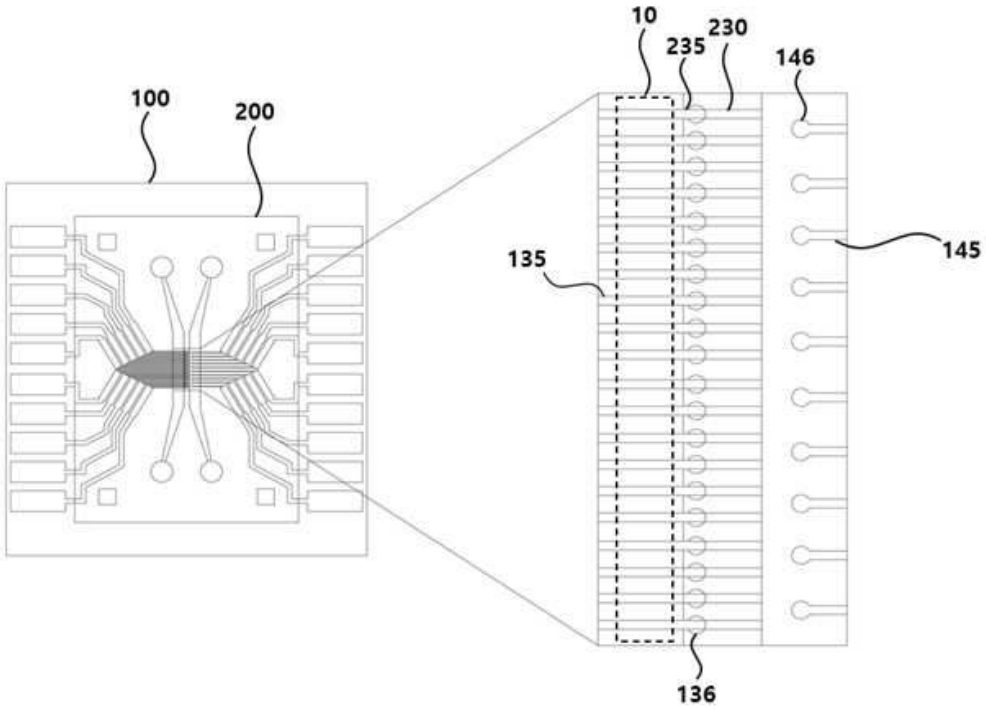
도면1


Mouse Cortical
Stem Cells(E12.5)
Brain-derived
Neurotropic Factor
Rapid & Efficient Neurite Guidance
Microelectrode Chip
Axonal
electrodes
Post
electrodes
Pt electrode

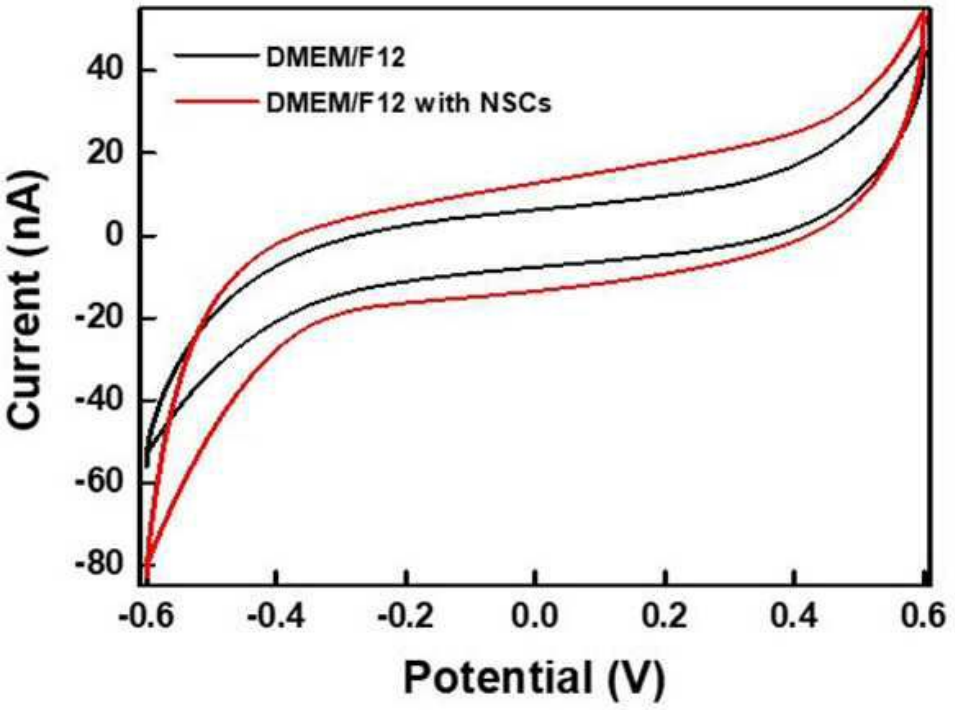
도면2


1000
110
115
117
100
217
227
127
200
125
130
120
140
215
210
225
220

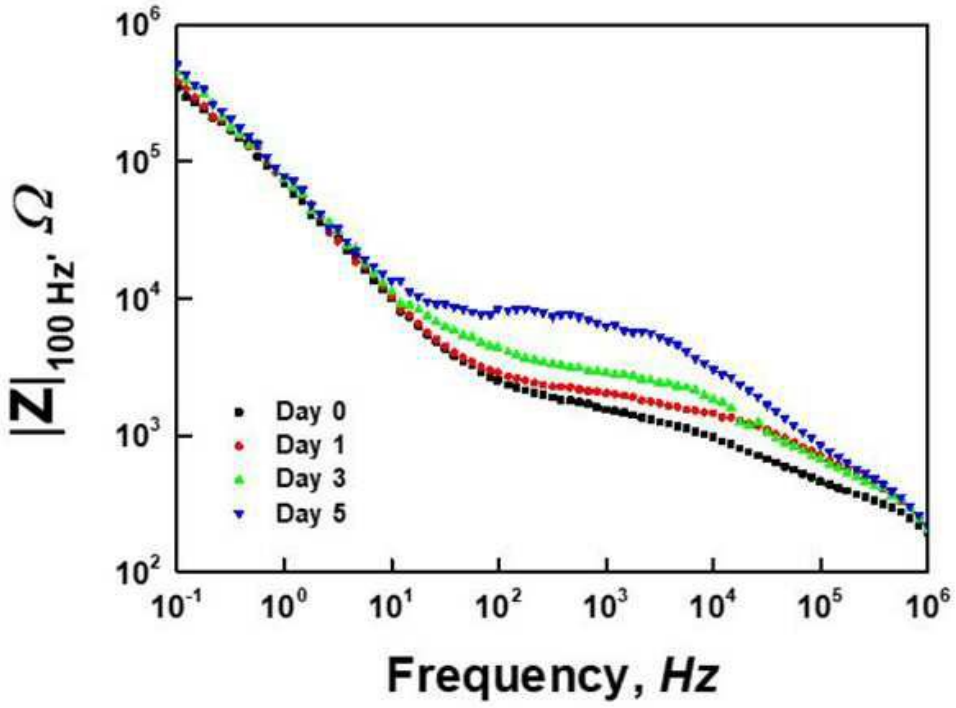
도면3


10
235
230
146
100
200
135
145
136

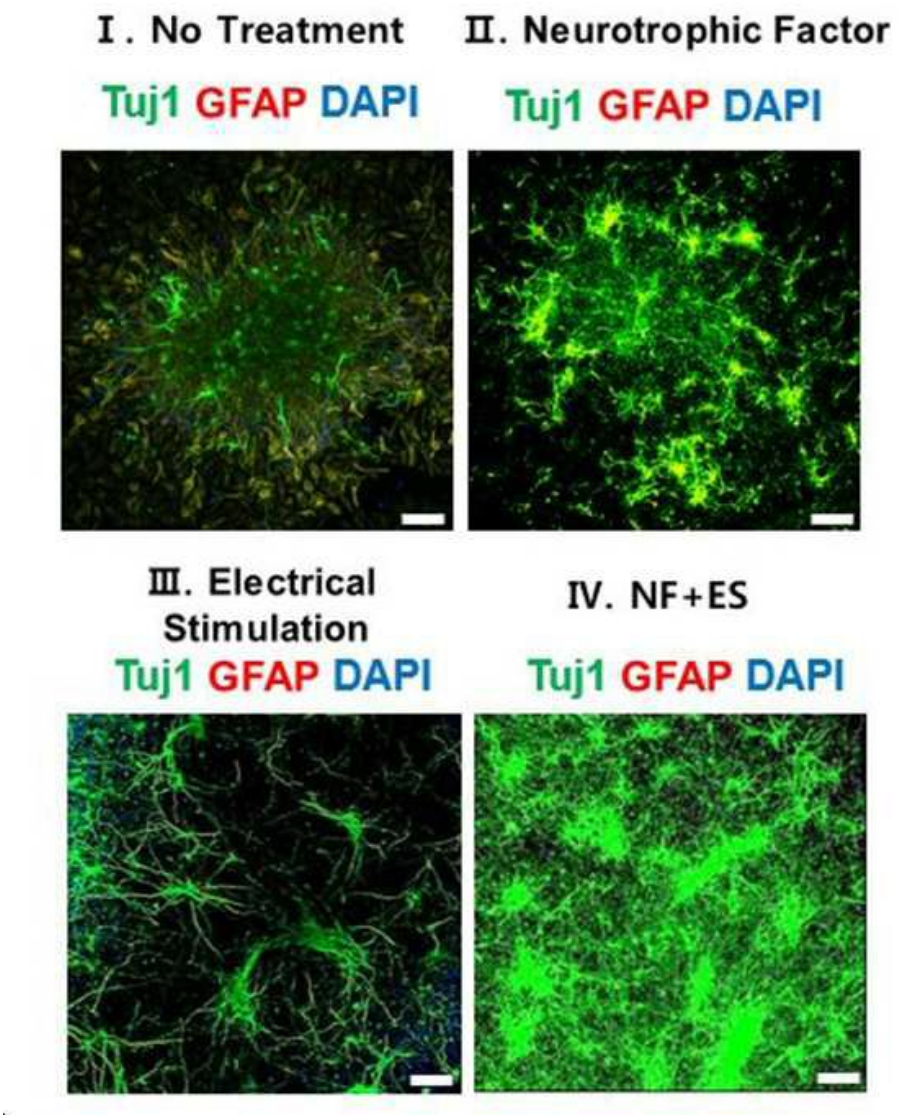
도면4


DMEM/F12
DMEM/F12 with NSCs
Current (nA)
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-0.6
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6
Potential (V)

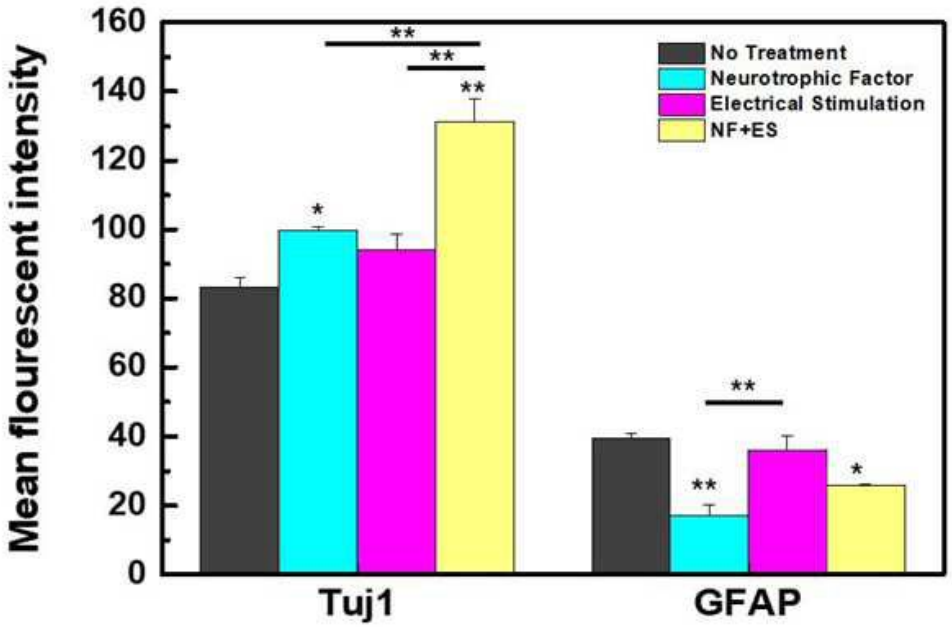
도면5


10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
$|Z|_{100\ Hz}$, Ω
Day 0
Day 1
Day 3
Day 5
10^{-1}
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
Frequency, *Hz*

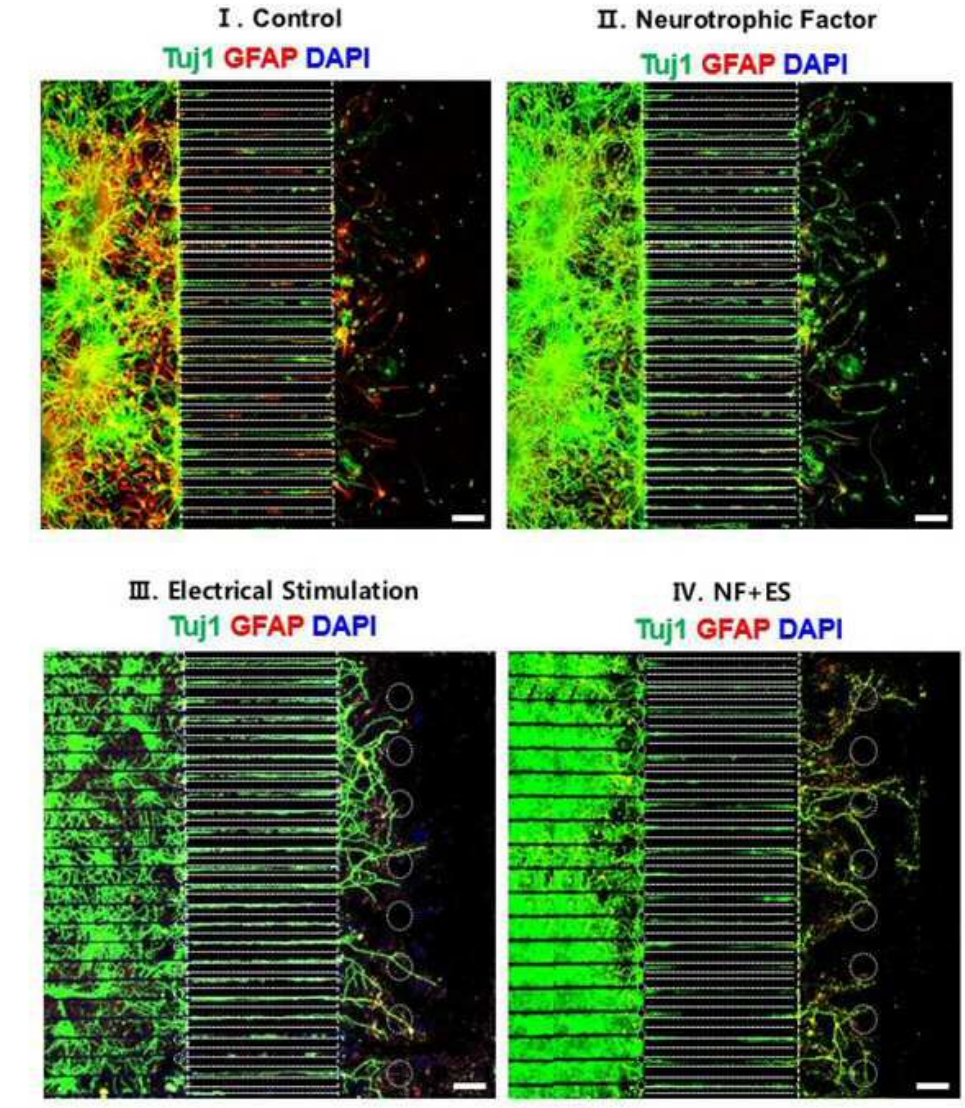
도면6


Ⅰ. No Treatment
Tuj1 GFAP DAPI
Ⅱ. Neurotrophic Factor
Tuj1 GFAP DAPI
Ⅲ. Electrical Stimulation
Tuj1 GFAP DAPI
Ⅳ. NF+ES
Tuj1 GFAP DAPI

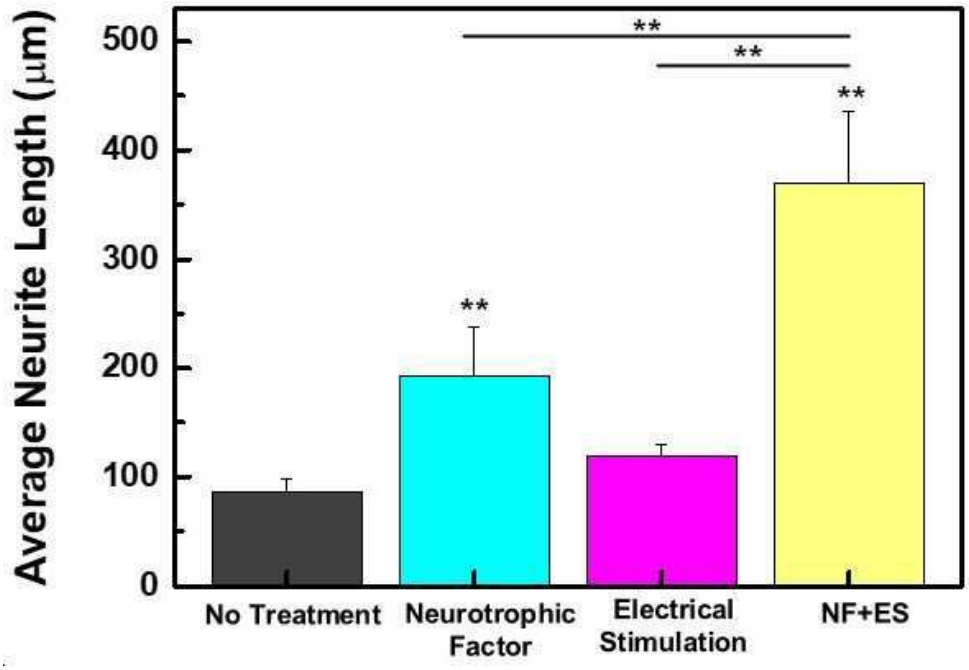
도면7


Mean flourescent intensity
160
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
*
**
**
*
No Treatment
Neurotrophic Factor
Electrical Stimulation
NF+ES
Tuj1
GFAP

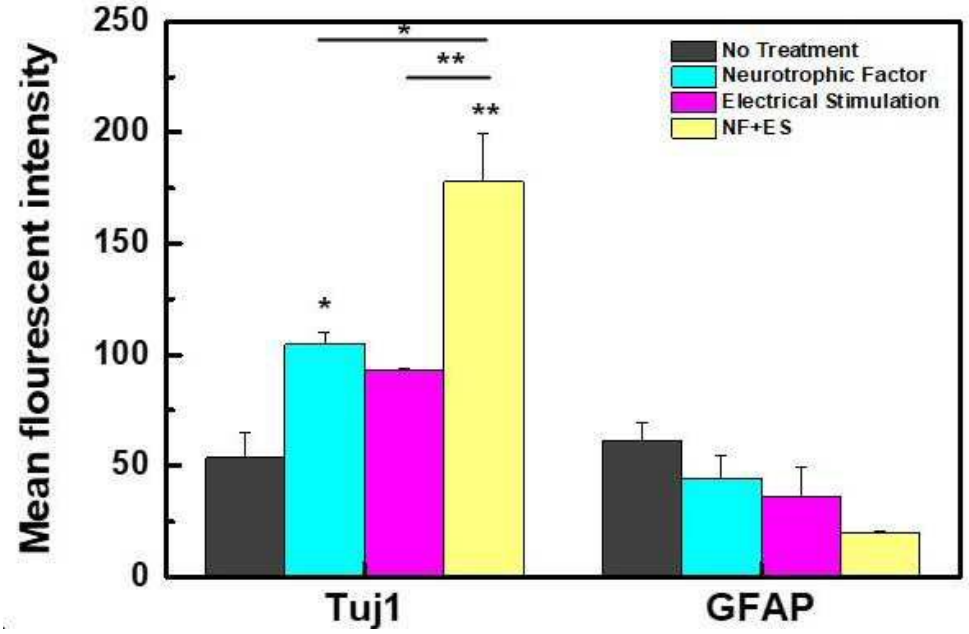
도면8


Ⅰ. Control
Tuj1 GFAP DAPI
Ⅱ. Neurotrophic Factor
Tuj1 GFAP DAPI
Ⅲ. Electrical Stimulation
Tuj1 GFAP DAPI
Ⅳ. NF+ES
Tuj1 GFAP DAPI

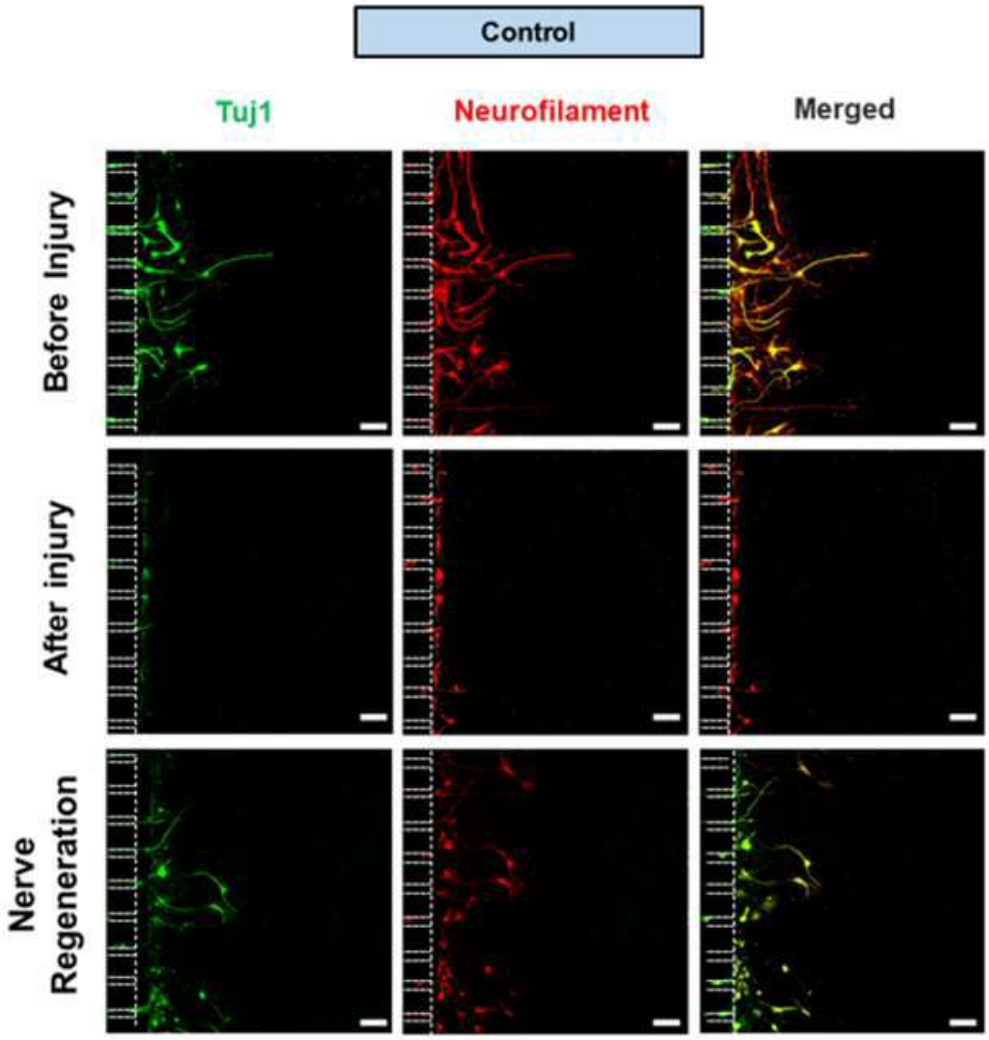
도면9


Average Neurite Length (μm)
500
400
300
200
100
0
**
**
**
**
No Treatment
Neurotrophic Factor
Electrical Stimulation
NF+ES

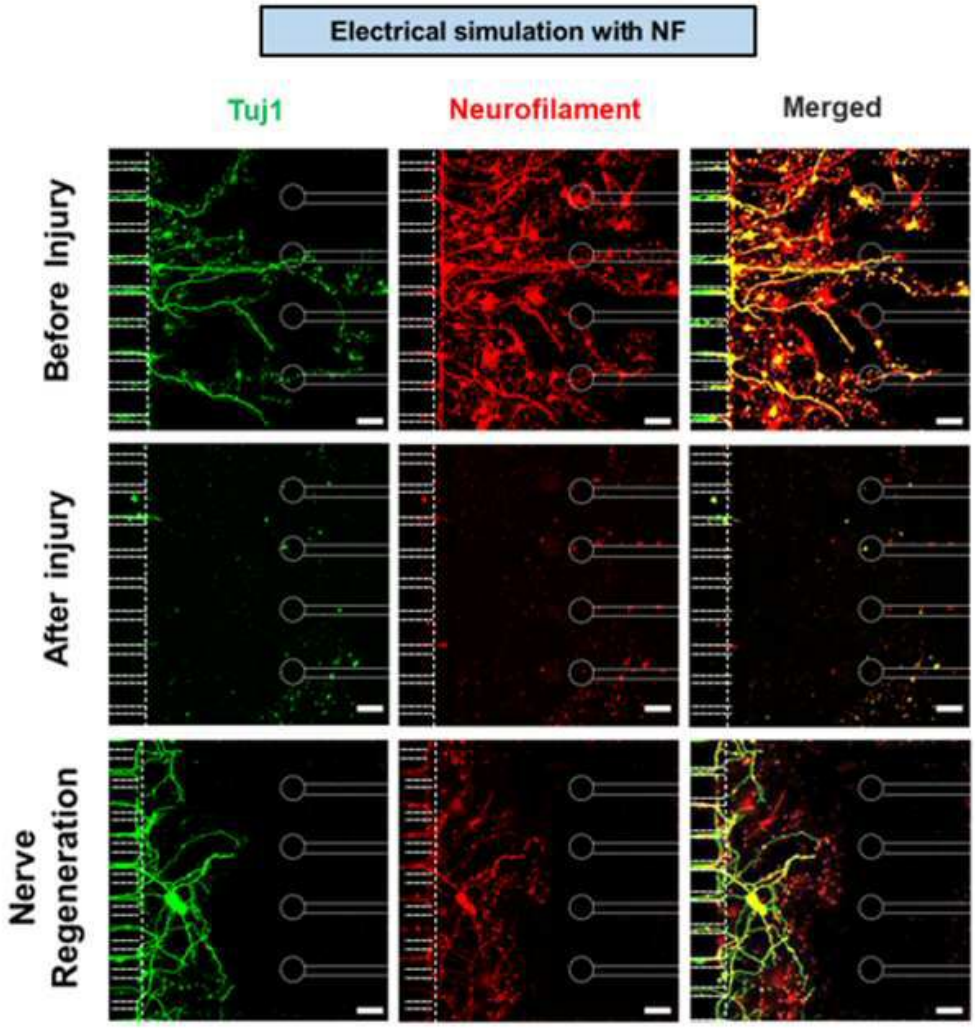
도면10


Mean flourescent intensity
250
200
150
100
50
0
*
**
**
*
No Treatment
Neurotrophic Factor
Electrical Stimulation
NF+ES
Tuj1
GFAP

도면11


Control
Tuj1
Neurofilament
Merged
Before Injury
After injury
Nerve Regeneration

도면12


Electrical simulation with NF
Tuj1
Neurofilament
Merged
Before Injury
After injury
Nerve Regeneration