(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월09일
(11) 등록번호 10-2224115
(24) 등록일자 2021년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) *B33Y 70/00* (2020.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0621 (2013.01)
B33Y 10/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0003898
(22) 출원일자 2020년01월10일
심사청구일자 2020년01월10일
(56) 선행기술조사문헌
JP2018161130 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경북대학교병원
대구광역시 중구 동덕로 130 (삼덕동2가)
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
김홍균
대구광역시 수성구 달구벌대로 2260, 101동 1201호
강현욱
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

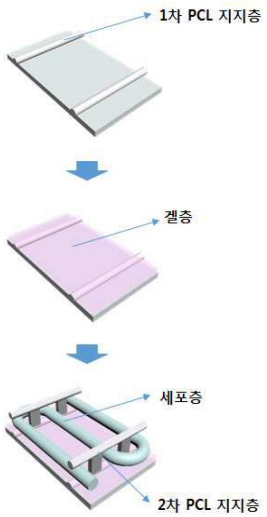
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 망막 세포 배양용 구조체 및 이의 활용**

(57) 요 약

본 발명은 3차원 바이오프린팅 기술이 적용된 망막 세포 배양용 구조체 및 이의 활용에 관한 것으로, 구체적으로는 망막 세포 배양용 구조체의 제조방법 및 이로부터 제조된 망막 세포 배양용 구조체, 이를 이용한 망막 생체외 모델의 제조방법 및 망막 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 상기 망막 세포 배양용 구조체는 생체내 망막과 유사한 형태적 및 기능적 특성을 갖는 망막 생체외 모델을 제공할 수 있으며, 이러한 망막 생체외 모델은 생체내에서 일어나는 병리현상과 상응성이 매우 높아 망막 질환을 개선 또는 치료 가능한 망막 질환 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
B33Y 70/00 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 2503/04 (2013.01)
C12N 2533/54 (2013.01)
C12N 2533/56 (2013.01)

(72) 발명자
손정현
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김경하
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(56) 선행기술조사문헌
JP2019520865 A
JP2020504625 A*
KR101949846 B1
KR1020150065697 A
KR1020180015092 A*
US20190290803 A1*
Biomaterials. 2014 Vol. 35(28), p. 8092-8102
Engineering 5 (2019) p. 777-794
TISSUE ENGINEERING Part C ,Vol. 18, No. 1, 2012
J Tissue Eng Regen Med. 2019;Vol.13; p.1394-1405.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465029032
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원육성(R&D)
연구과제명 (제6세부) 심뇌혈관질환 환경을 구현한 조직공학 기반 3차원 바이오칩 개발과 신약 후보물질 검증 플랫폼 구축
기 여 율 6/10
과제수행기관명 경북대학교병원
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711087167
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해외우수기관유치(R&D)
연구과제명 UNIST-WFIRM-UniBasel 생체장기모사 연구센터
기 여 율 4/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 일정한 간격으로 위치하는 한 쌍의 1차 고분자 지지층을 형성하는 단계;

b) 상기 한 쌍의 1차 고분자 지지층의 주변에 열용융성 겔층을 형성하는 단계;

c) 상기 1차 고분자 지지층의 상부에 위치하며, 상기 한 쌍의 1차 고분자 지지층을 서로 연결하도록 세포층을 형성하는 단계; 및

d) 상기 1차 고분자 지지층의 상부에 위치하며, 상기 1차 고분자 지지층의 상부에 위치한 세포층을 덮도록 2차 고분자 지지층을 형성하는 단계

를 포함하며,

상기 c) 단계의 세포층은 뮐러 세포를 포함하는 것인, 뮐러 세포 배양용 구조체의 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 방법은 토출 방식의 3차원 인쇄법인 것인 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 a) 단계의 고분자는 생분해성 고분자로, 에스테르, 아미드, 티오에스테르, 카보네이트, 우레탄, 우레아, 아미드, 안하이드라이드, 알지네이트, 히알루론산, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로오스 메틸 셀룰로오스, 키토산, 실크, 폴리디옥산, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트산-co-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리(L-락타이드-co-카프로락톤), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스테르, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리-N-이소프로필아크릴아마이드, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드-폴리에틸렌옥사이드 공중합체 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에서 있어서,

상기 b) 단계의 열용융성 겔은 30 내지 40℃에서 용융되는 것인 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 b) 단계의 열용융성 겔은 젤라틴 및 콜라겐으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 b) 단계는 주변 온도가 20℃ 이하인 상태에서 겔층을 형성하는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 b) 단계의 겔층은 1차 고분자 지지층의 높이 1을 기준으로, 0.8 내지 1.2배 높이를 갖는 것인 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계의 세포층은 겔층의 상부에 위치하는 것인 방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 c) 단계의 세포층은 세포와 함께 피브리노겐 및 콜라겐으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 기질을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 d) 단계의 2차 고분자 지지층은 생분해성 고분자로, 에스테르, 아미드, 티오에스테르, 카보네이트, 우레탄, 우레아, 아미드, 안하이드라이드, 알지네이트, 히알루론산, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로오스 메틸 셀룰로오스, 키토산, 실크, 폴리디옥산, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리(락트산-co-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리(L-락타이드-co-카프로락톤), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스테르, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리-N-이소프로필아크릴아마이드, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드-폴리에틸렌옥사이드 공중합체 및 이들의 공중합체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.

청구항 12

청구항 1의 방법으로 제조된 뮐러 세포 배양용 구조체.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 구조체는 1차 고분자 지지층 및 2차 고분자 지지층으로 이루어진 지지체, 겔층 및 세포층을 포함하는 것인 구조체.

청구항 14

청구항 12의 뮐러 세포 배양용 구조체를 30 내지 40℃에서 3일 이상 배양하는 단계를 포함하는 망막 생체외 모

델의 제조방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 단계는 세포층의 길이 방향으로 세포 정렬 현상을 유도하는 것인 방법.

청구항 16

i) 청구항 14의 방법으로 제조된 망막 생체외 모델을 제공하는 단계;

ii) 상기 모델에 세포 스트레스 유발 물질을 접촉시키는 단계;

iii) 상기 모델에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

iv) 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 뮐러 세포의 사이토카인 또는 성장인자 발현을 저해하는 시험물질을 망막 질환 치료제로 선정하는 단계

를 포함하는 망막 질환 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 3차원 바이오프린팅 기술이 적용된 망막 세포 배양용 구조체 및 이의 활용에 관한 것으로, 구체적으로는 망막 세포 배양용 구조체의 제조방법 및 이로부터 제조된 망막 세포 배양용 구조체, 이를 이용한 망막 생체외 모델의 제조방법 및 망막 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전 세계적으로 4,200만여 명이 실명(blindness)으로 고통받는 것으로 추산되며, 이보다 많은 사람들이 심각한 망막 질환(retinal disorder)으로 고통받고 있을 것으로 예상된다. 서양에서는 당뇨성 망막병증(diabetic retinopathy), 색소성 망막염(retinitis pigmentosa; RP), 습성 및 건성 노인성 황반변성(age-related macular degeneration; ARMD), 황반 부종(macular edema)을 비롯한 염증성 질환, 망막 중심 정맥 폐쇄(central vein occlusion), 망막에 영향을 주는 포도막염(uveitis), 증식성 유리체 망막병증(proliferative vitreoretinopathy) 등과 같은 망막 질환을 실명의 유력한 원인으로 보고 있다.

[0004] 최근 우리나라도 고령화 사회에 접어들면서 60세 이상의 성인에서 실명을 유발하는 노인성 황반변성, 당뇨 합병증으로 발생하는 당뇨성 망막병증 등의 환자가 점진적으로 증가하고 있어, 이러한 망막 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 물질에 대해 개발 필요성이 요구되고 있다.

[0005] 망막은 안구의 가장 안쪽을 덮고 있는 투명한 신경조직으로, 안구의 바깥쪽에서부터 안쪽까지 망막색소상피층, 광수용체층, 바깥경계막, 바깥핵층, 바깥얼기층, 속핵층, 속얼기층 신경절세포층, 신경섬유층, 속경계막으로 10개의 층으로 구성된다. 대부분의 망막 질환 연구에서는 생체 유래 또는 줄기세포로부터 분화 유도된 망막 세포를 배양 접시에 부착시켜 배양하고 있으나, 이러한 부착 배양된 망막 세포는 방향성이 없고 평평한 2차원 형태를 갖는 등 실제 망막 세포와 형태 및 구조가 다르기 때문에 생체내(*in vivo*) 망막과 다른 반응성을 나타낼 수 있다. 따라서, 배양 접시에서 부착 배양된 망막 세포는 생체내 연구를 위한 실험도구로 적합하지 않으며, 추가로 실험동물을 이용한 실험이 요구된다는 문제가 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 3차원 바이오프린팅 기술을 이용하여 망막 질환의 생체내 연구에 활용 가능하도록 3차원 형태를 갖는 망막 세포를 배양할 수 있는 망막 세포 배양용 구조체를 제조함으로써 생체내 망막과 형태적 및 기능적 특성이 유사한 망막 생체외 모델을 제공하고, 이를 통해 망막 질환에 효과적인 치료제를 스크리닝하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2018-0088713호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2018-0042437호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 망막 세포 배양용 구조체의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 망막 세포 배양용 구조체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 망막 세포 배양용 구조체를 이용한 망막 생체외 모델의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 망막 세포 배양용 구조체를 이용한 망막 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] **<망막 세포 배양용 구조체의 제조방법>**

[0015] 일 구체예에 따르면, 본 발명은 도 1을 참조하여 망막 세포 배양용 구조체의 제조방법을 제공한다. 구체적으로는, a) 일정한 간격으로 위치하는 한 쌍의 1차 고분자 지지층을 형성하는 단계; b) 상기 한 쌍의 1차 고분자 지지층의 주변에 열용융성 겔층을 형성하는 단계; c) 상기 1차 고분자 지지층의 상부에 위치하며, 상기 한 쌍의 1차 고분자 지지층을 서로 연결하도록 세포층을 형성하는 단계; 및 d) 상기 1차 고분자 지지층의 상부에 위치하며, 상기 1차 고분자 지지층의 상부에 위치한 세포층을 덮도록 2차 고분자 지지층을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0016] 이러한 방법은 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 것으로, 세포를 포함하는 바이오잉크를 분사시킬 수 있는 토출 방식의 3차원 인쇄법을 통해 수행할 수 있다.

[0017] 상기 a) 내지 d) 단계를 자세히 설명하면, 다음과 같다.

[0019] 상기 a) 단계는 세포층을 위, 아래로 고정하는 지지체 중 세포층의 하부를 고정하는 1차 고분자 지지층을 형성하는 과정이다.

[0020] 상기 고분자는 생물 대사에 의해 분해가 일어나 저분자량 화합물로 변하는 생분해성 고분자 물질로, 당업계에서 공지된 생분해성 고분자를 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 생분해성 고분자는 카르보닐기(C=O)의 한쪽에 산소, 질소 또는 황 원자가 결합된 에스테르, 아미드 및 티오에스테르를 포함하는 고분자, 카르보닐기에 양쪽에 산소, 질소 또는 황 원자가 결합된 카보네이트, 우레탄, 우레아 등을 포함하는 고분자, 또는 두 개의 카르보닐기 사이에 산소, 질소 또는 황 원자가 연결된 아미드, 안하이드라이드 등을 포함하는 고분자를 포함할 수 있다. 상기 생분해성 고분자의 일례로는 에스테르, 아미드, 티오에스테르, 카보네이트, 우레탄, 우레아, 아미드, 안하이드라이드, 알지네이트, 히알루론산, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로오스 메틸 셀룰로오스, 키토산, 실크(silk), 폴리디옥산(Polydioxanone; PDO), 폴리락트산(polylactic acid), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리(락트산-co-글리콜산)(poly(lactic-coglycolic acid); PLGA), 폴리카프로락톤(polycarprolactone; PCL), 폴리(L-락타이드-co-카프로락톤)(PLCL), 폴리안하이드리드(polyanhydride), 폴리오르토에스테르(polyorthoester), 폴리비닐알코올(polyviniy alcohol), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 폴리-N-이소프로필아크릴아마이드(poly(N-isopropyl acrylamide)), 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드-폴리에틸렌옥사이드 공중합체(polyethyleneoxide-polypropyleneoxide-polyethyleneoxide copolymer) 및 이들의 공중합체 등일 수 있다. 바람직하게는, 폴리(락트산-co-글리콜산), 폴리락트산 또는 폴리카프로락톤일 수 있다.

[0021] 상기 폴리카프로락톤은 약 60℃의 낮은 용융점을 가지며 물리적 성형이 용이하여 토출 분사에 적합하고, 생체친화적인 재료로 세포 독성이 없어 세포의 생존력이나 기능성에 거의 문제를 일으키지 않는다는 장점이 있다.

[0022] 이러한 1차 고분자 지지층 형성 과정은 예를 들면, 고분자를 용융점 이상의 온도에서 용융한 후 분사 장치를 통해 베이스의 상부에 한 쌍의 1차 고분자 지지층 형성을 수행할 수 있다. 이때, 베이스는 세포 배양 접시, 유리 또는 플라스틱 재질의 슬라이드 등일 수 있다. 한 쌍의 1차 고분자 지지층은 적어도 2개 이상의 고분자 지지층으로 이루어지며, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상일 수 있다.

[0024] 상기 b) 단계는 베이스로부터 떨어진 세포층의 형상을 구현하기 위해 일시적으로 세포층의 하부와 접촉하여 세포층을 지지하는 겔층을 형성하는 과정이다. 이때, 일시적인 겔층 형성을 위해 열용융성 겔을 사용하는 것이 바람직하다.

[0025] 상기 열용융성 겔은 상온 (15 내지 25℃)에서 고형 형상이나, 가열에 의해 특정 온도에 달하면 용융하는 성질을 갖는 겔로, 당업계에 공지된 열용융성 겔을 제한 없이 사용할 수 있다. 이러한 열용융성 겔은 겔층으로 형성되어 세포층과 함께 이루어진 구조체 상태로 배양되기 때문에 세포의 생존율 또는 기능에 영향을 미치지 않는 온도 범위의 용융점을 갖는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 열용융성 겔은 30 내지 40℃에서 용융되는 것일 수 있다. 이때, 열용융성 겔은 주성분으로 젤라틴, 콜라겐 등으로 이루어질 수 있으며, 용융점을 제어하기 위해 주성분의 함량이 조절될 수 있다. 또한, 열용융성 겔은 점도를 높이기 위해 히알루론산을 더 포함할 수 있다.

[0026] 상기 젤라틴은 온도반응성(thermo-reversible) 특성을 가지고 있어 약 18℃ 에서 겔의 형태로 구조를 유지하는 반면, 약 37℃에서 액체의 형태로 변한다는 특징이 있다.

[0027] 이러한 겔층 형성 과정은 예를 들면, 겔을 용융점 이상의 온도에서 용융한 후 분사 장치를 통해 베이스의 상부에 위치한 한 쌍의 1차 고분자 지지층을 제외한 베이스 공간, 특히 한 쌍의 1차 고분자 지지층이 서로 마주하는 공간에 겔층 형성을 수행할 수 있다. 이때, 주변 온도, 특히 분사 장치 외부 온도가 20℃ 이하인 상태에서 겔층을 형성하는 것일 수 있다.

[0028] 형성된 겔층은 1차 고분자 지지층의 높이와 동일하거나 상이한 것으로, 바람직하게는 1차 고분자 지지층의 높이 1을 기준으로, 0.8 내지 1.2배 높이를 갖는 것일 수 있다.

[0030] 상기 c) 단계는 1차 고분자 지지층 및 겔층의 상부에 세포층을 형성하는 과정이다. 이때, 세포층은 일정한 간격으로 위치한 한 쌍의 1 차 고분자 지지층을 연결하도록 형성되는 것이 바람직하다.

[0031] 상기 세포층은 망막을 구성하는 광수용 세포, 지지 세포, 혈관 세포 등의 망막 세포를 포함할 수 있으며, 1종 이상의 세포를 포함할 수 있다. 이때, 세포가 2종 이상일 경우, 하나의 세포층에 모두 포함되거나 각각의 세포층에 포함될 수 있다. 상기 망막 세포는 뮬러 세포, 간세포, 추세포, 원뿔세포, 막대세포, 쌍극세포, 신경절세포, 혈관세포 등일 수 있다.

[0032] 이러한 세포층은 세포와 함께 배양시 세포가 부착하여 생존할 수 있는 기질(matrix)를 더 포함할 수 있다. 상기 기질의 일례로는 피브리노겐, 콜라겐 등일 수 있다. 또한, 세포층은 세포층의 안정적인 프린팅 공정이 진행될 수 있도록 젤 형상(gel formation) 유지를 위해 온도반응성 특성을 갖는 젤라틴, 점도(viscosity) 증가를 위한 히알루론산 등을 더 포함할 수 있다. 이때, 세포층은 피브리노겐의 농도가 0.5 내지 1 %(w/v)인 기질 용액에 세포의 밀도가 0.5×10^6 ~ 1.0×10^7 세포/mL 되도록 혼합하여 형성된 것일 수 있다.

[0033] 이와 같이 세포와 기질로 이루어진 세포층은 배양 전에 기질의 가교 형성을 위해 가교제가 처리될 수 있다. 상기 가교제는 기질의 종류에 따라 선택될 수 있으며, 일례로는 효소, 디비닐술폰(divinyl sulfone), 비스 에틸 카보디이미드(bis ethyl carbodiimide), 부탄디올 디글리시딜 에테르(butanediol diglycidyl ether) 등일 수 있다.

[0034] 이러한 세포층 형성 과정은 예를 들면, 망막 세포와 기질을 혼합하여 바이오잉크를 제조한 후 분사 장치를 통해 한 쌍의 1차 고분자 지지층이 연결되도록 1차 고분자 지지층 및 겔층의 상부에 겔층 형성을 수행할 수 있다. 이때, 세포층은 적어도 1개 이상이며, 베이스와 직접 접촉되거나 세포층이 2개 이상일 경우 다른 세포층과 접촉되지 않도록 주의된다.

[0035] 형성된 세포층은 양 말단이 1차 고분자 지지층의 상부에 위치할 수 있다.

[0037] 상기 d) 단계는 세포층을 고정하는 2차 고분자 지지층을 형성하는 과정이다.

[0038] 상기 2차 고분자 지지층은 1차 고분자 지지층과 함께 세포층을 위, 아래로 고정시켜 배양시 세포의 정렬(alignment)을 유도할 수 있다. 이때, 2차 고분자 지지층은 1차 고분자 지지층과 같이 생분해성 고분자로서 상기 1차 고분자 지지층과 재료가 동일하거나 상이할 수 있으며, 1차 고분자 지지층과 높이가 동일하거나 상이할

수 있다.

[0039] 이러한 2차 고분자 지지층 형성 과정은 1차 고분자 지지층 형성 과정과 동일할 수 있으며, 예를 들면, 고분자를 용융점 이상의 온도에서 용융한 후 분사 장치를 통해 일부 1차 고분자 지지층 및 세포층의 상부에 한 쌍의 2차 고분자 지지층 형성을 수행할 수 있다.

[0040] 형성된 2차 고분자 지지층의 하부는 1차 고분자 지지층의 상부와 일부 접촉하고 있으며, 1차 고분자 지지층과 접촉하지 않은 부분은 세포층의 상부와 접촉할 수 있다.

[0042] **<망막 세포 배양용 구조체>**

[0043] 다른 일 구체예에 따르면, 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 망막 세포 배양용 구조체를 제공한다.

[0044] 상기 망막 세포 배양용 구조체는 베이스와 함께 1차 고분자 지지층 및 2차 고분자 지지층으로 이루어진 지지체, 겔층 및 세포층을 포함하는 것일 수 있다. 이때, 세포층은 겔층의 상부에 위치하며, 세포층 내에서 세포가 기질이 부착되지 않은 상태이다.

[0045] 이러한 망막 세포 배양용 구조체는 일반 세포 배양 접시와 달리, 망막 세포가 방향성을 가질 수 있는 환경을 제공하며, 이를 통해 생체내 망막과 형태 및 구조가 유사한 생체외 망막 모델을 제공할 수 있다.

[0047] **<망막 생체외 모델의 제조방법>**

[0048] 다른 일 구체예에 따르면, 본 발명은 상기 망막 세포 배양용 구조체를 30 내지 40℃에서 3일 이상 배양하는 단계를 포함하는 망막 세포의 배양 방법을 제공한다.

[0049] 구체적으로는, 배양 단계를 통해 구조체 중 겔층을 제거하고, 세포층 내에서 세포층의 길이 방향으로 세포 정렬 현상을 유도하는 것일 수 있다.

[0050] 상기 배양 단계는 겔층의 용융점 (젤라틴 용융점: 약 37℃) 이상의 온도에서 배양하는 것으로, 겔층을 용융시켜 제거할 수 있다. 겔층이 제거된 구조체에서, 세포층은 지지체로만 고정되고 베이스와 직접 접촉되지 않아 공중에 뜬 상태이다.

[0051] 이때, 세포층 내에서는 세포들이 기질에 부착하기 위해 모든 방향으로 수축(contraction) 현상이 일어나는데 지지체의 고정에 의해 세포층이 세로축(longitudinal axis)으로 수축하지 못하는 반면, 가로축(lateral axis)으로만 수축이 발생함으로써 배양하는 동안 지속적인 가로축 방향의 수축력이 세포에도 가해져 세포의 자가 정렬(self-induced alignment)이 일어날 수 있다. 이러한 세포 자가 정렬은 일반적인 배양 접시를 이용한 망막 세포 배양에서 유도될 수 없는 현상으로, 제조된 망막 생체외 모델은 생체내 망막과 유사한 형태적 특성뿐만 아니라 기능적 특성 또한 나타낼 수 있다.

[0052] 예를 들면, 배양 접시에 구조체를 넣고, 구조체가 잠길 정도의 배지를 넣은 후 37℃, 5% CO_2 세포배양기에서 3일 동안 배양을 수행할 수 있다. 이때, 세포층 내에서 세포가 부착할 수 있는 기질의 형성을 돕기 위해 가교제가 처리될 수 있다.

[0054] **<망막 질환 치료제 스크리닝 방법>**

[0055] 다른 일 구체예에 따르면, 상기 망막 세포 배양용 구조체를 이용한 망막 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 구체적으로는, i) 상기 방법으로 제조된 망막 생체외 모델을 제공하는 단계; ii) 상기 모델에 세포 스트레스 유발 물질을 접촉시키는 단계; iii) 상기 모델에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및 iv) 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 망막 세포의 사이토카인 또는 성장인자 발현을 저해하는 시험물질을 망막 질환 치료제로 선정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 상기 i) 내지 iv) 단계를 자세히 설명하면, 다음과 같다.

[0058] 상기 i) 단계는 망막 질환 치료제 스크리닝의 도구로 사용 가능한 망막 생체외 모델을 제공하는 과정이다.

[0059] 상기 망막 생체외 모델은 망막 세포 배양용 구조체를 배양함으로써 구조체 내 망막 세포가 생체내 망막과 유사한 형태적 및 기능적 특징을 갖는 것이다.

[0060] 예를 들면, 망막 세포 배양용 구조체를 통해 배양된 뮐러 세포는 생체내와 유사하게 정렬된 형태를 보이며, 세포 끝부분(endfeet)에 세포 내부로 향하는 내향성 칼륨 채널(inward-rectifier potassium channel)이 위치할 수 있다.

[0062] 상기 ii) 단계는 망막 세포에 스트레스 유발 물질을 처리하여 인위적인 스트레스 환경을 제공하는 과정이다.

[0063] 정상적인 망막 세포는 균형을 이루며 사이토카인 또는 성장인자를 발현하지만, 고포도당, 저산소 등과 같은 스트레스 환경에서는 HIF-1(Hypoxia-inducible factor-1), VEGF(vascular endothelial growth factor), MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1), IL-1β, TNF-α 등의 발현 또는 생산 불균형이 초래될 수 있다. 따라서, 망막 세포에 인위적인 스트레스 환경을 제공함으로써 망막을 손상시켜 목적하는 망막 질환과 유사한 환경을 유도할 수 있다.

[0064] 예를 들면, 망막 생체외 모델의 뮐러 세포에 고포도당을 처리하여 IL-1β, TNF-α, VEGF 및 MCP-1의 발현이 증가되도록 유도함으로써 당뇨성 망막 질환과 유사한 환경을 제공할 수 있다.

[0066] 상기 iii) 단계는 손상된 망막 환경이 유도된 망막 생체외 모델에 시험물질을 처리하는 과정이다.

[0067] 상기 시험물질은 손상된 망막 환경에 대한 개선 또는 치료 가능성 여부를 검사하기 위해 스크리닝에 이용되는 미지의 물질로, 항체, 앱타머(aptamer), 미모토프(mimotope), 펩티드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, miRNA, PNA, 리보자임, DNAzyme, 유기 화합물, 무기 화합물 등일 수 있다.

[0068] 상기 망막 생체외 모델은 생체내 망막과 매우 유사한 병리기전을 나타내므로, 시험물질이 질병의 발병 또는 진행 과정과 관련된 인자, 특히 사이토카인 또는 성장인자의 발현 또는 생산에 미치는 영향 (약리활성)을 평가할 수 있다.

[0070] 상기 iv) 단계는 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, 측정 결과에 따라 시험물질을 망막 질환 치료제로 선정하는 과정이다.

[0071] 상기 시험물질이 손상된 망막 환경에서 증가된 사이토카인 또는 성장인자의 발현을 저해할 경우에는 목적하는 망막 질환의 개선 또는 치료제로 선정될 수 있다. 이때, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿(western blot), 노던 블럿(northern blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis) 등의 방법을 통해 발현 정도를 측정하여 분석할 수 있다.

[0072] 예를 들면, 고포도당 환경의 뮐러 세포에 시험물질을 처리한 경우에서 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 IL-1β, TNF-α, VEGF 및 MCP-1의 발현이 유의적으로 저해되면, 그 시험물질을 당뇨성 망막 질환 치료제로 선정할 수 있다.

발명의 효과

[0074] 본 발명에 따르면, 망막 세포 배양용 구조체는 생체내 망막과 유사한 형태적 및 기능적 특성을 갖는 망막 생체외 모델을 제공할 수 있으며, 이러한 망막 생체외 모델은 생체내에서 일어나는 병리현상과 상응성이 매우 높아 망막 질환을 개선 또는 치료 가능한 망막 질환 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 망막 세포 배양용 구조체의 제조방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 예에 따른 망막 세포 배양용 구조체를 이용한 뮐러 세포 배양시 배양 3일 후 뮐러 세포의 형태 변화를 나타낸 모식도이다.

도 3은 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 망막 세포 배양용 구조체를 이용한 뮐러 세포 배양시 passage 3에서의 뮐러 세포의 단백질 GS, GFAP, Vimentin 발현을 확인한 이미지이다.

도 4는 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 망막 세포 배양용 구조체를 이용한 뮐러 세포 배양시 passage 3에서의 뮐러 세포의 단백질 GS, GFAP, Vimentin 발현 변화를 분석한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 배양 접시에서 배양된 뮐러 세포 (2D)와 망막 세포 배양용 구조체를 이용하여 배양된 뮐러 세포 (3D)의 단백질 GS 발현 양상을 비교한 이미지이다.

도 6은 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 배양 접시에서 배양된 뮐러 세포 (2D)와 망막 세포 배양용 구조체를 이용하여 배양된 뮐러 세포 (3D)의 단백질 Kir4.1, Phalloidin 발현 양상을 비교한 이미지이다.

도 7은 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 배양 접시에서 배양된 뮐러 세포 (2D)에 대해 고포도당 조건과 정상 포도당 조건에서의 GS, Kir4.1의 발현 양상, mRNA 및 단백질 발현량을 비교한 그래프 및 이미지이다. 정상 포도당 조건 대비 통계적 유의성; * P<0.01, *** P<0.0001.

도 8은 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 배양 접시에서 배양된 뮐러 세포 (2D)에 대해 고포도당 조건 (HG)과 정상 포도당 조건 (NG)에서의 GFAP, Vimentin의 발현 양상, mRNA 및 단백질 발현량을 비교한 그래프 및 이미지이다. 정상 포도당 조건 대비 통계적 유의성; ** P<0.001.

도 9는 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 망막 세포 배양용 구조체를 이용하여 배양된 뮐러 세포 (3D)에 대해 고포도당 조건 (HG)과 정상 포도당 조건 (NG)에서의 GS, Kir4.1, GFAP, Vimentin, RAGE의 발현 양상을 비교한 이미지이다.

도 10은 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 망막 세포 배양용 구조체를 이용하여 배양된 뮐러 세포 (3D)에 대해 고포도당 조건 (HG)과 정상 포도당 조건 (NG)에서의 GS, Kir4.1, GFAP, Vimentin, RAGE의 mRNA 발현량을 비교한 그래프이다. 정상 포도당 조건 대비 통계적 유의성; ** P<0.001, *** P<0.0001.

도 11은 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 배양 접시에서 배양된 뮐러 세포 (2D)와 망막 세포 배양용 구조체를 이용하여 배양된 뮐러 세포 (3D)에 대해 고포도당 조건 (HG)과 정상 포도당 조건 (NG)에서의 GS, Kir4.1, GFAP, Vimentin, RAGE의 mRNA 발현량을 비교한 그래프이다. 정상 포도당 조건 대비 통계적 유의성; * P<0.01, ** P<0.001, *** P<0.0001.

도 12는 은 본 발명의 일 예에 따른 실험 결과로, 배양 접시에서 배양된 뮐러 세포 (2D)와 망막 세포 배양용 구조체를 이용하여 배양된 뮐러 세포 (3D)에 대해 고포도당 조건 (HG), 정상 포도당 조건 (NG), AGE-BSA 조건에서의 IL-1β, MCP-1, TNF-α, VEGF-A의 분비량을 비교한 그래프이다. 정상 포도당 조건 대비 통계적 유의성; * P<0.01, ** P<0.001, *** P<0.0001. 고포도당 조건 대비 통계적 유의성; # P<0.01, ### P<0.0001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하, 첨부된 도면을 참조하며 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0079] **1. 실험방법**

[0080] **1-1. 뮐러 세포 분리 및 배양**

[0081] SD 랫트(Sprague-Dawley Rat) 모체 1 마리에서 생후 6일생 14마리를 얻어 사용하였다. 먼저, 안구를 적출하여 PBS에 담근 후 PBS로 2 ~ 3회 세척하였다. 안구에 많은 조직이 붙어 있을 경우 오염 발생을 방지하기 위해 주변 조직을 제거하였다.

[0082] 뮐러 세포를 분리하기 위해, 안구의 각막과 공막의 경계에 칼집을 낸 후 포셉으로 각막과 공막을 벌려 망막 세포가 오염되지 않도록 렌즈를 먼저 적출하고, 망막을 분리하여 HBSS 5 mL에 담가 두었다. 망막이 담긴 HBSS 5 mL에 HBSS (콜라게나제 60 U/mL 및 0.25% 트립신-filtered 함유) 20 mL를 넣고 파이펫팅(pipetting) 후 항온수조 (37℃에서 10분 동안 인큐베이션 하였다. 이후, 배지 (DMEM-5.5 mM 글루코스 내 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 함유) 25 mL을 넣고 (1:1의 비율), 파이펫 팁(tip)으로 살짝 섞어 주었다. 총 28개의 안구에서 약 2×10^8 세포를 얻었다.

[0083] 배지 (DMEM-5.5 mM 글루코스 내 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 함유), 배양 접시(dish)를 사용하여 분리된 세포를 약 0.5×10^7개/150Φ dish에 분주하고, 37℃, CO_2 세포배양기에서 배양하였다. 하루 뒤, 배양 접시를 배지로 아주 살짝 헹구고서 4 ~ 5일 동안 배지를 교체하지 않고 배양 후 계대배양하였다. 뮐러 세포의 순도를 높이기 위해, 계대배양 5 ~ 6시간 후 바닥에 붙지 않은 세포들을 버리고 배지를 새로 갈아주었다. 이후, Passage 3까지 배양하여 실험에 사용하였다.

[0085] **1-2. 배양용 구조체를 이용한 뮐러 세포 배양**

[0086] **(1) 1차 고분자 지지층 형성**

[0087] 폴리카프로락톤(Polycaprolactone; PCL) (Polysciences, Inc) 20 ~ 40g을 프린팅 실린지에 넣고 80 ~ 95℃의 온도로 가열하여 용융시켰다. 이후, 용융된 PCL을 500 ~ 700 kPa의 압축 디스펜서(dispenser) (Musashi

Engineering, Inc)로 분사시켜 베이스 위에 0.8 ~ 2.4 cm 간격으로 직경 0.3 mm, 높이 0.2 mm의 1차 PCL 지지층 2개를 형성하였다.

[0089] **(2) 겔층 형성**

[0090] 파우더 형태의 젤라틴(gelatin)과 히알루론산(Hyaluroic acid)을 MEM(Minimum Essential Media)에 각각 35 ~ 40 mg/mL, 2.5 ~ 3 mg/mL로 넣고 37℃에서 최대한 녹인 후 0.45 ㎛ 필터를 통해 여과하였다. 이후, 용액을 300 ㎛ 메탈 노즐을 통해 디스펜서로 분사시켜 베이스 위의 1차 PCL 지지층 주변에 높이 160 ~ 240 ㎛로 겔층을 형성하였다.

[0092] **(3) 세포층 형성**

[0093] 파우더 형태의 피브리노겐(fibrinogen), 젤라틴(gelatin)과 히알루론산(Hyaluroic acid)을 MEM(Minimum Essential Media)에 각각 5 ~ 10 mg/mL, 35 ~ 40 mg/mL, 2.5 ~ 3 mg/mL로 넣고 37℃에서 최대한 녹인 후 0.45 ㎛ 필터를 통해 여과하였다. 여과된 용액에 Passage 4까지 배양된 뮐러 세포를 1.0 ~ 3.0 x 10^6 cells/mL 의 농도가 되도록 혼합한 후, 바이오 잉크를 300㎛ 메탈 노즐을 통해 디스펜서로 분사시켜 2개의 1차 PCL 지지층이 서로 연결되도록 겔층 위에 높이 160 ~ 240 ㎛로 세포층을 형성하였다.

[0095] **(4) 2차 고분자 지지층 형성**

[0096] 1차 고분자 지지체 형성과 동일한 방법으로, 용융된 PCL을 500 ~ 700 kPa 의 디스펜서로 분사시켜 1차 PCL 지지층 위에 높이 0.2 mm로 2차 PCL 지지층을 형성하였다.

[0098] 최종적으로 1차 및 2차 PCL 지지층으로 이루어진 지지체, 겔층 및 세포층을 포함하는 구조체를 형성하였다. 구조체를 배양 접시에 넣고 구조체가 잠길 정도의 배지 (DMEM-5.5 mM 글루코스 내 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 함유)를 넣은 후 37℃, 5% CO_2 세포배양기에서 3일 동안 배양하여 세포의 정렬을 유도하였다.

[0100] **1-3. 뮐러 세포 활성화 유도**

[0101] 세포의 활성화를 유도하기 위해, 세포 배지에 고농도의 포도당 (25 mM) 또는 AGE-BSA (50 μg/mL)를 72시간 동안 처리하였다.

[0102] AGE(Advanced glycation end products)는 고혈당 최종당화산물로, 당이 단백질 또는 지방에 비효소 반응으로 결합된 분자로 당뇨를 유발하고, 당뇨망막병증을 악화시키는 요인 중 하나로 알려진 물질이다. 본 실험에 사용된 AGE-BSA는 BSA를 포도당과 함께 배양하여 만든 물질이다.

[0103] 활성화된 세포는 세포의 형태, 단백질 및 RNA 발현을 분석하는데 사용되었고, 배양액은 세포의 사이토카인 및 성장인자 분비를 분석하는데 사용되었다.

[0105] **1-4. 유세포 분석**

[0106] 세포를 1 x 10^5개씩 각각의 e-tube에 옮겨 담은 후 1,500 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 세포를 수집하였다. 이후, 세포를 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 4℃에서 1시간 동안 고정하였다. PBS 내 1% BSA 함유 용액 (PBS-BSA)을 이용하여 세포를 2회 세척하고, 원심분리를 통해 세포 펠렛을 모아 0.1% 트리톤 X-100 함유 PBS-BSA를 넣고 4℃에서 15분 동안 배양하였다. 이후, 하기 표 1과 같이 항체를 PBS-BSA에 희석하여 세포와 4℃에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS-BSA로 2회 세척한 후 각 tube 당 세포 5,000개 이상씩 FACS Calibur (BD Biosciences)로 측정하였다.

표 1

[0107]

항체	종(Species)	희석배율
Glutamine synthetase (GS)	Rabbit	1:1000
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Rabbit	1:500
Receptor advanced glycation end products (RAGE)	Rabbit	1:200
Vimentin	Mouse	1:200
Inwardly rectifying K^+ channel (Kir4.1)	Rabbit	1:200
β-actin	Mouse	1:800
Phalloidin Alexa Fluor 488 conjugated	-	1:400

[0109] **1-5. 면역형광 분석**

[0110] 세포를 커버 슬립 위에 올려 놓고 순차적으로 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 상온에서 30분 동안 고정하였다. 이후, 고정된 세포에 상기 표 1의 항체를 처리한 후 형광현미경으로 세포를 관찰하였다.

[0112] **1-6. 정량(quantitative) PCR 분석**

[0113] 세포 9.5 x 10^5개를 Trizol 시약 (Ambion, CA, USA) 500 μL에 녹여서 e-tube에 수집한 후 상온에서 5분 이상, -80℃에서 1일 이상 보관하였다. 냉동된 세포를 녹여 클로로포름 100 μL를 처리한 후 경계면이 사라질 때까지 볼텍싱하고(vortexing) 상온에서 15분 이상 배양하였다. 이후, 4℃에서 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상등액만을 취하였다 (200 μL). 여기에 상등액과 동일한 양의 이소프로판올을 첨가하고 아래-위로 뒤집으면서 섞어주었다. 이후, 상온에서 15분 배양한 후 4℃에서 13,000 rpm으로 15분 원심분리하고 상등액을 버렸다. 세포 펠렛에 70% 에탄올 1 mL를 넣고 4℃에서 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하고 상등액을 버렸다 (2회 반복 수행). 펠렛이 남아 있는 e-tube를 뒤집어서 건조하여 pallet에 물기가 닿지 않게 하였다. 건조된 펠렛에 RNase-Free water 20 μL를 넣고 볼텍싱하고 -80℃에서 보관하였다.

[0114] 추출된 RNA 2 μg로 High Capacity cDNA reverse Transcription Kit (Applide biosystems, Forster, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, cDNA 10 ng에 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applide biosystems, Forster city, CA, USA) 5 μL, 정방향(Forward) 및 역방향(Reverse) 프라이머 (10 pmol/mL) (하기 표 2 참조) 각각 1 μL, double-distilled H2O 를 첨가하여 최종 용량이 10 μL가 되게하였다. StepOnePlus Real-Time PCR system을 이용하여 cDNA 증폭 결과를 얻어 Comparative CT법으로 분석하였다.

표 2

[0115]

프라이머		염기서열(5' > 3')	서열번호
GS	Forward	TGGGAGCAGACAGAGCCTAT	1
	Reverse	CAGGAATGGGCTTAGGATCA	2
Kir4.1	Forward	CAAGGACCTGTGGACAACCT	3
	Reverse	GGGATTCAAGGGAGAAGAGG	4
GFAP	Forward	ACATCGAGATCGCCACCTAC	5
	Reverse	ATCTCCACGGTCTTCACCAC	6
Vimentin	Forward	CCCTCACCTGTGAAGTGGAT	7
	Reverse	TTCCAGCAGCTTCCTGTAGGT	8
RAGE	Forward	CTACCTATTCCTGCAGCTTC	9
	Reverse	CTGATGTTGACAGGAGGGCTTTCC	10
β-actin	Forward	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	11
	Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	12

[0117] **1-7. 웨스턴 블롯 분석**

[0118] 세포에 RIPA(Radioimmunoprecipitati on assay) 완충용액 1 mL, 프로테아제 인히비터 1 μL (GenDEPOT, Katy, Texas, USA)를 첨가한 후 4℃에서 2시간 동안 배양하여 세포를 용해하였다. 용해물(lysate)을 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상등액만을 취하였다. 단백질 정량 후 단백질 20 μg을 10 % SDS-PAGE 겔에서 80 V, 2시간 동안 전기 영동하였다. 이후, 젤의 단백질을 PVDF 막에 100 V, 1시간 30분 동안 이동시켰다 (transfer). PVDF 막을 1% BSA-TBS에서 1시간 동안 배양한 후 1차 항체와 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이후, 0.1% Tween 20-TBS로 3회 세척하고 2차 항체 (HRP-conjugated)를 상온에서 2시간 동안 배양하였다. PVDF 막에 SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 을 처리한 후 ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)로 단백질 밴드를 측정하고, image J를 이용하여 이미지를 분석하였다.

[0120] **1-8. 루미넥스 분석(Luminex assay)**

[0121] 세포 배양액 1 mL를 -20℃에 보관한 후 D & P Biotech (Buk-gu, Daegu, Republic of Korea)에 의뢰하여 IL-1β, MCP-1, TNF-α, VEGF-A의 분비를 측정하였다.

[0123] **2. 결과**

[0124] **2-1. 뮐러 세포의 단백질 발현 비교**

[0125] 랫트에서 분리된 뮐러 세포를 배양 접시에 부착시켜 Passage 3까지 배양하였다. 배양된 뮐러 세포에서의 단백질 발현을 확인하기 위해, 유세포 분석 및 면역형광 분석을 수행하였다.

[0126] 도 3을 참조하면, passage 3의 뮐러 세포는 뮐러 세포의 특이적 마커인 GS와, 세포 이동과 관련된 단백질인 GFAP 및 Vimentin의 발현이 관찰되었다. GS는 글루타메이트와 암모니아를 축합하여 글루타민을 생성함으로써 세포 독성 조절에 관여하는 단백질이다.

[0127] 도 4를 참조하면, 뮐러 세포의 passage가 증가할수록 정제되는 뮐러 세포의 순도가 높아지는 것을 확인하였다.

[0129] Passage 3의 뮐러 세포를 이용하여 배양용 구조체를 제조하였고, 이를 3일 동안 배양시켜 구조체로부터 뮐러 세포 (3D 뮐러 세포)를 회수하였다. 뮐러 세포의 세포 형태 및 단백질 발현을 확인하기 위해, 면역형광 분석을 수행하였다. 이때, 배양용 구조체를 사용하지 않고 배양 접시에서 부착 배양된 뮐러 세포 (2D 뮐러 세포)와 비교하였다.

[0130] 도 5 및 6을 참조하면, 3D 뮐러 세포는 2D 뮐러 세포에 비해 방향성을 가지며 길게 뻗은 형태로 이동한 것으로 관찰되었고, 특히 세포질에서 세포 이동과 관련된 단백질 GS, Phalloidin이 전체적으로 발현된 것으로 확인되었다. 또한, 2D 뮐러 세포에는 내향성 칼륨 채널 관련 단백질 Kir4.1이 세포에 산재되어 있는 반면, 3D 뮐러 세포에는 끝부분(endfeet)에 위치하는 것으로 확인되었다.

[0131] 결과적으로, 본 발명에 따른 망막 세포 배양용 구조체를 통해 생체내 망막과 유사한 형태적 특성을 갖는 망막 세포 (망막 생체외 모델)를 제공할 수 있다.

[0133] **2-2. 고포도당 조건에서 뮐러 세포의 단백질 발현 확인**

[0134] 이전 연구에서는 당뇨 환자군의 망막에서 GS, Kir4.1의 발현이 정상군에 비해 감소된 반면, GFAP, Vimentin이 정상군에 비해 증가된 것으로 확인되었다 (*Teri L Belecky Adams et al., 2014*; *Pannicke et al., 2006*). 2D 뮐러 세포 및 3D 뮐러 세포에 대해 정상 포도당 조건(normal glucose; NG) 또는 고포도당 조건(high glucose; HG)에서의 단백질 발현을 확인하기 위해, 면역형광 분석과 함께 단백질 수준, mRNA 수준으로 분석하였다.

[0135] 도 7 및 8을 참조하면, 2D 뮐러 세포는 고포도당 조건에서 정상 포도당 조건에 비해 GS, Kir4.1의 발현이 유의적으로 감소된 반면, GFAP, Vimentin의 발현이 유의적으로 증가된 것으로 확인되었다.

[0136] 도 9 및 10을 참조하면, 3D 뮐러 세포는 고포도당 조건에서 정상 포도당 조건에 비해 GS, Kir4.1의 발현이 유의적으로 감소된 반면, GFAP, Vimentin의 발현이 유의적으로 증가된 것으로 확인되었다.

[0137] 도 11을 참조하면, 2D 뮐러 세포와 3D 뮐러 세포에서 단백질의 mRNA 발현이 동일하게 변화하는 경향을 보였으나, 3D 뮐러 세포에서 고포도당 조건일 때 GS, Kir 4.1 유전자의 발현이 정상 포도당 조건에 비해 유의적으로 감소되고, GFAP 유전자의 발현이 유의적으로 증가된 것으로 확인되었다.

[0138] 결과적으로, 당뇨 상태와 유사한 환경을 제공하는 고포도당 조건에서, 3D 뮐러 세포가 2D 뮐러 세포에 비해 뚜렷한 반응성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 3D 뮐러 세포가 망막 생체외 모델로서 당뇨 질환 관련 연구를 수행하는데 적절한 실험 도구로 제공될 수 있음을 시사한다.

[0140] **2-3. 고포도당 조건에서 뮐러 세포의 사이토카인 및 성장인자 분비 확인**

[0141] 다양한 포도당 조건에서 뮐러 세포의 상태에 따른 사이토카인 및 성장인자 발현의 변화를 확인하기 위해, 2D 뮐러 세포, 3D 뮐러 세포 (printing) 및 3D 뮐러 세포 (aligned)에 정상 포도당, 고포도당 및 AGE-BSA를 처리하여 3일 동안 배양 후 세포 배양액을 분석하였다. 이때, 3D 뮐러 세포 (printing)은 형성된 구조체를 1일 동안 배양하여 세포가 정렬되지 않은 상태이며 (도 2의 Day1 참조), 3D 뮐러 세포 (aligned)는 형성된 구조체를 3일 동안 배양하여 세포가 정렬된 상태이다 (도 2의 Day3 참조).

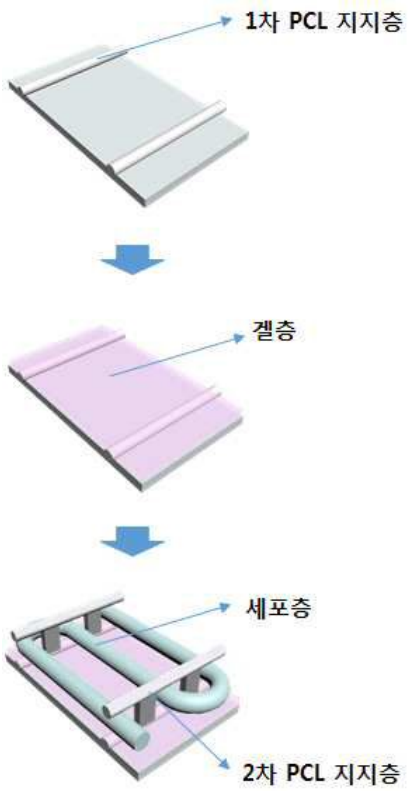
[0142] 도 12를 참조하면, 3D 뮐러 세포 (printing) 및 3D 뮐러 세포 (aligned)는 고포도당 조건에서 정상 포도당 조건에 비해 IL-1ß, MCP-1, TNF-α, VEGF-A 분비량이 유의적으로 증가된 것으로 확인되었다. 반면, 2D 뮐러 세포는 고포도당 조건에 대한 사이토카인 및 성장인자의 유의적인 증가를 보이지 않았다.

[0143] 결과적으로, 망막과 유사하게 입체 구조로 유도된 3D 뮐러 세포가 인공적인 당뇨 환경에서 생체내 당뇨와 유사

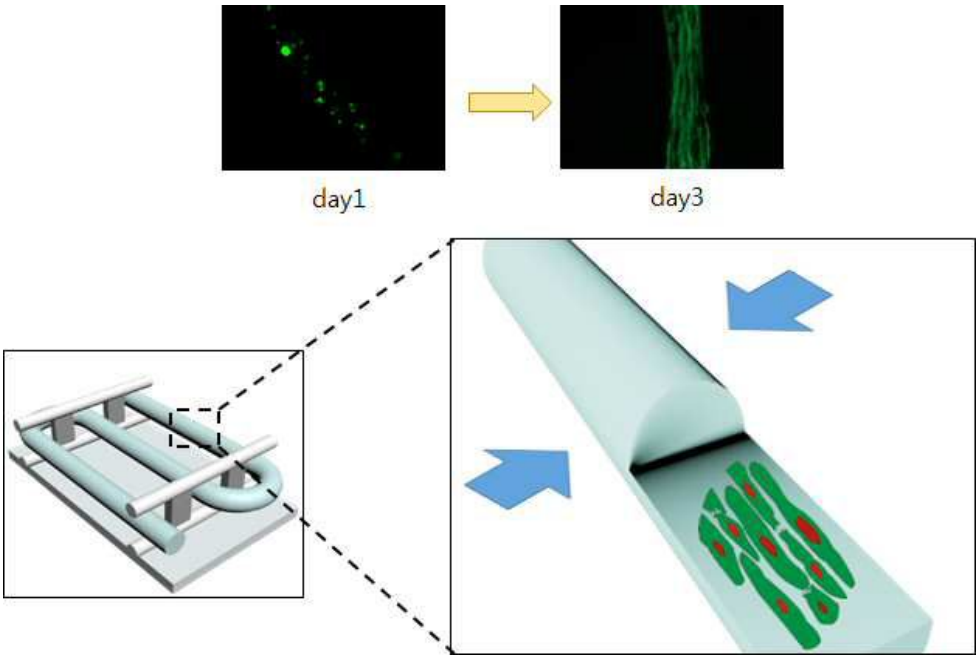
한 반응을 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명에 따른 망막 세포 배양용 구조체를 통해 생체내 망막과 유사한 특성을 갖는 망막 세포(망막 생체외 모델)를 제공할 수 있다.

도면

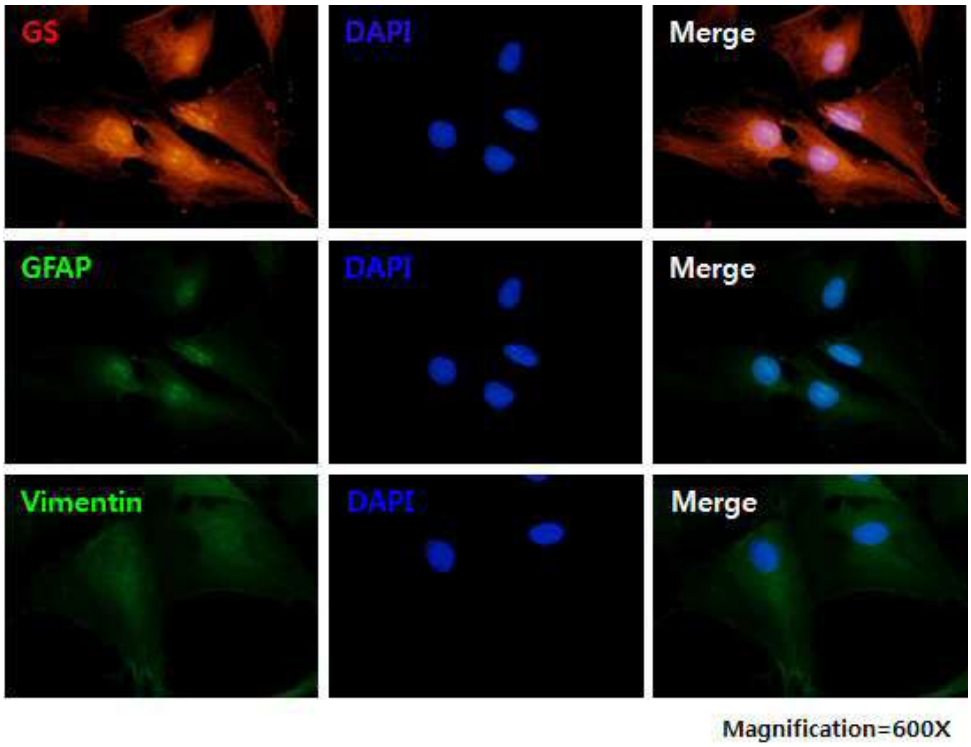
도면1



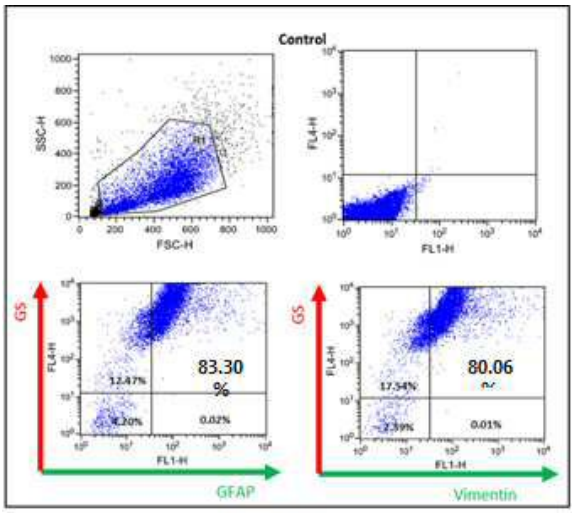
도면2



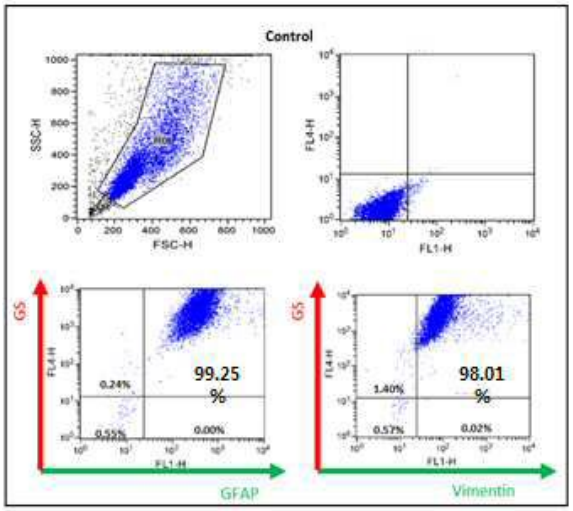
도면3


GS
DAPI
Merge
GFAP
DAPI
Merge
Vimentin
DAPI
Merge
Magnification=600X

도면4

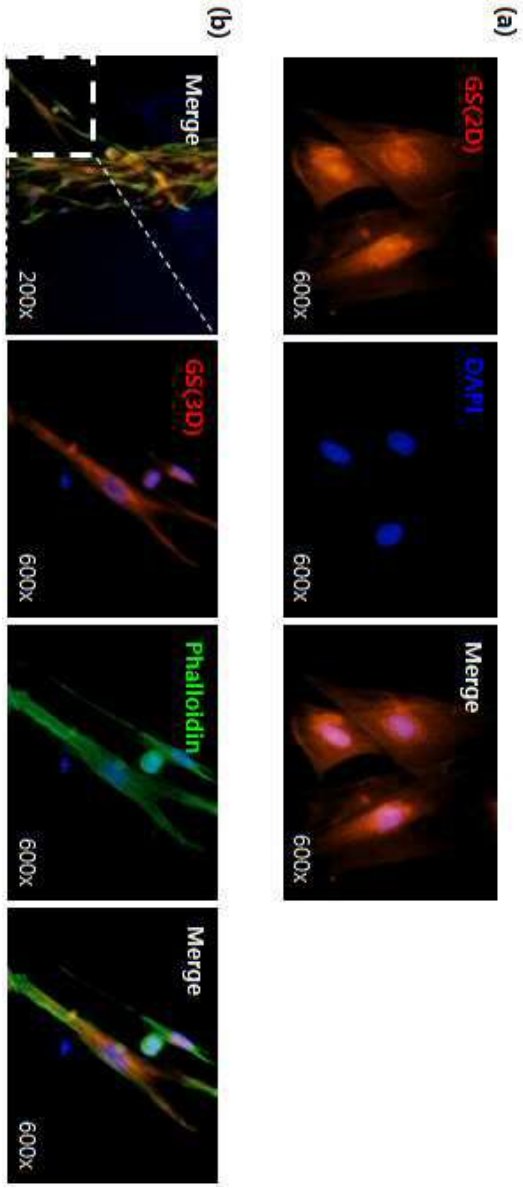


Passage 2

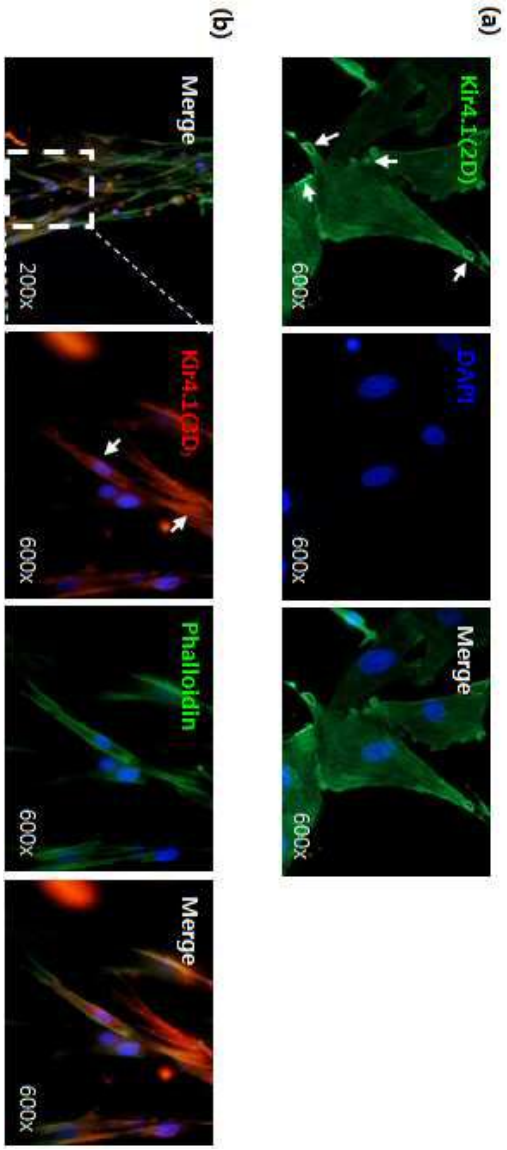


Passage 3

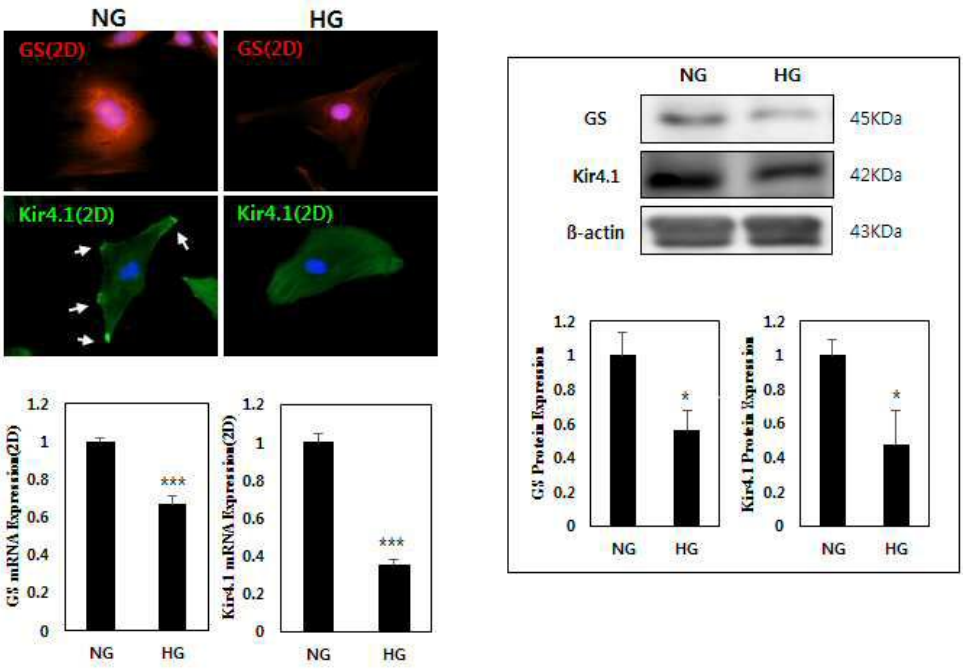
도면5


(a)
GS(2D)
600x
DAPI
600x
Merge
600x
(b)
Merge
200x
GS(3D)
600x
Phalloidin
600x
Merge
600x

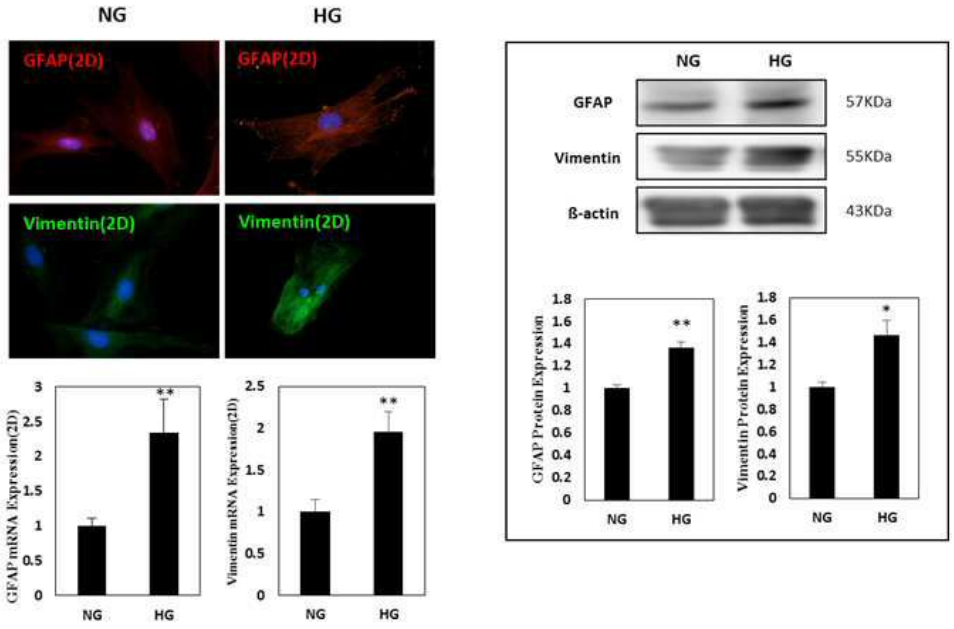
도면6


(a)
Kir4.1(2D)
600x
DAPI
600x
Merge
600x
(b)
Merge
200x
Kir4.1(3D)
600x
Phalloidin
600x
Merge
600x

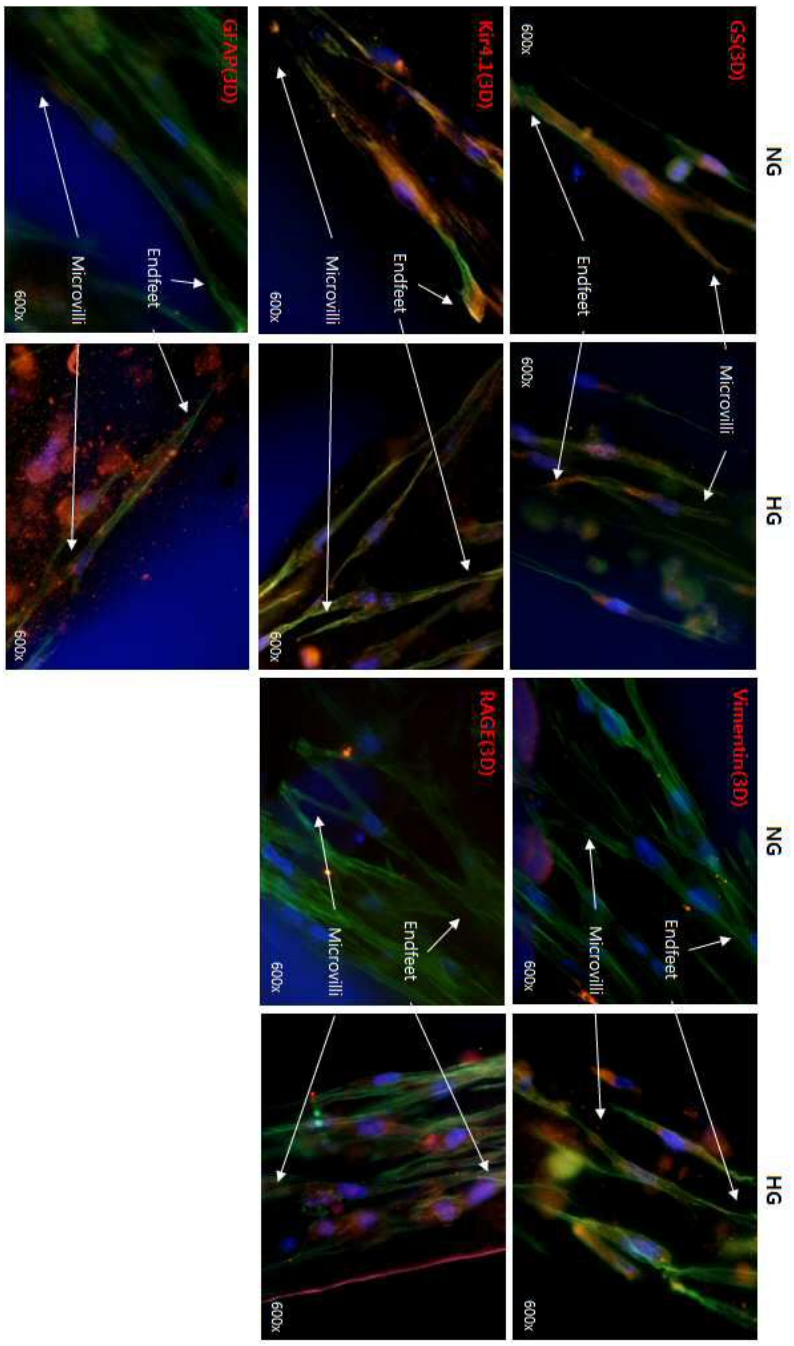
도면7


NG
HG
GS(2D)
GS(2D)
Kir4.1(2D)
Kir4.1(2D)
GS mRNA Expression(2D)
Kir4.1 mRNA Expression(2D)
***
***
NG
HG
NG
HG
NG
HG
GS
Kir4.1
ß-actin
45KDa
42KDa
43KDa
GS Protein Expression
Kir4.1 Protein Expression
*
*

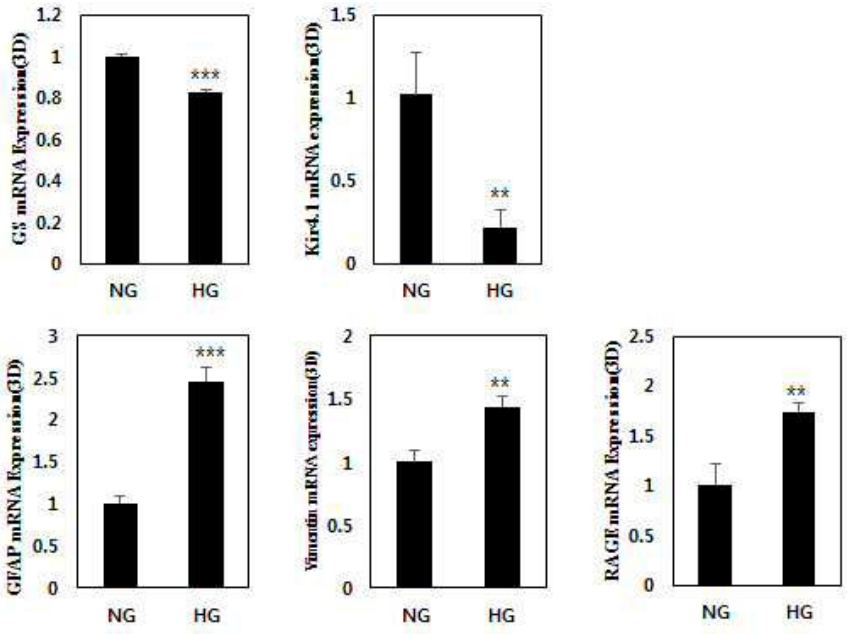
도면8


NG
HG
GFAP(2D)
GFAP(2D)
Vimentin(2D)
Vimentin(2D)
GFAP mRNA Expression(2D)
Vimentin mRNA Expression(2D)
**
**
NG
HG
NG
HG
NG
HG
GFAP
Vimentin
ß-actin
57KDa
55KDa
43KDa
GFAP Protein Expression
Vimentin Protein Expression
**
*

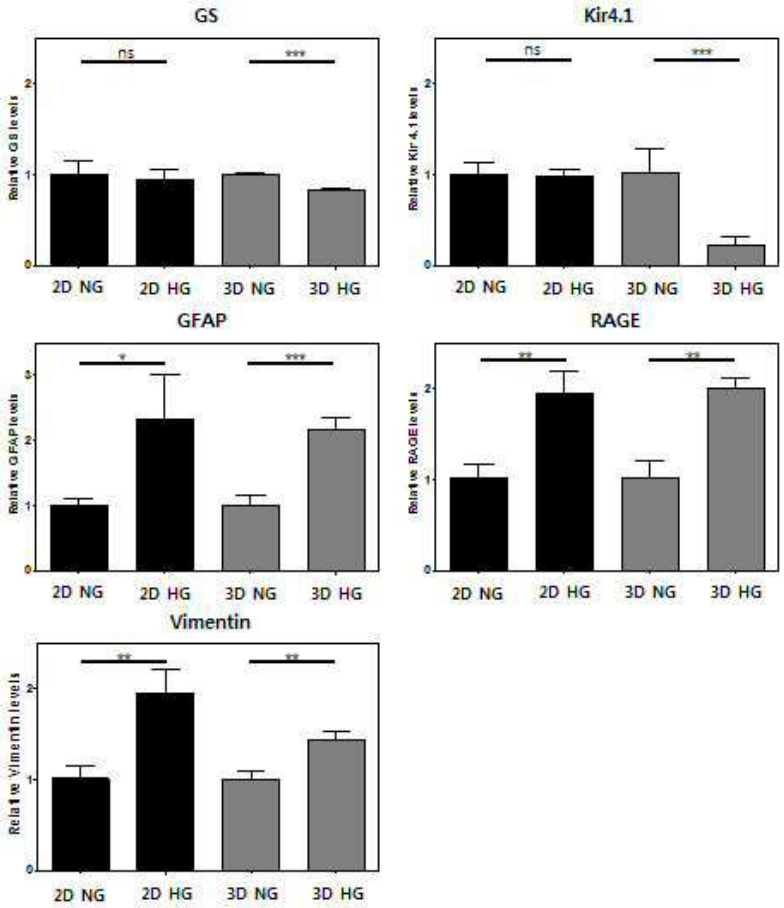
도면9


NG
HG
NG
HG
GS(3D)
Kir4.1(3D)
Vimentin(3D)
RAGE(3D)
GFAP(3D)
Endfeet
Microvilli
600x

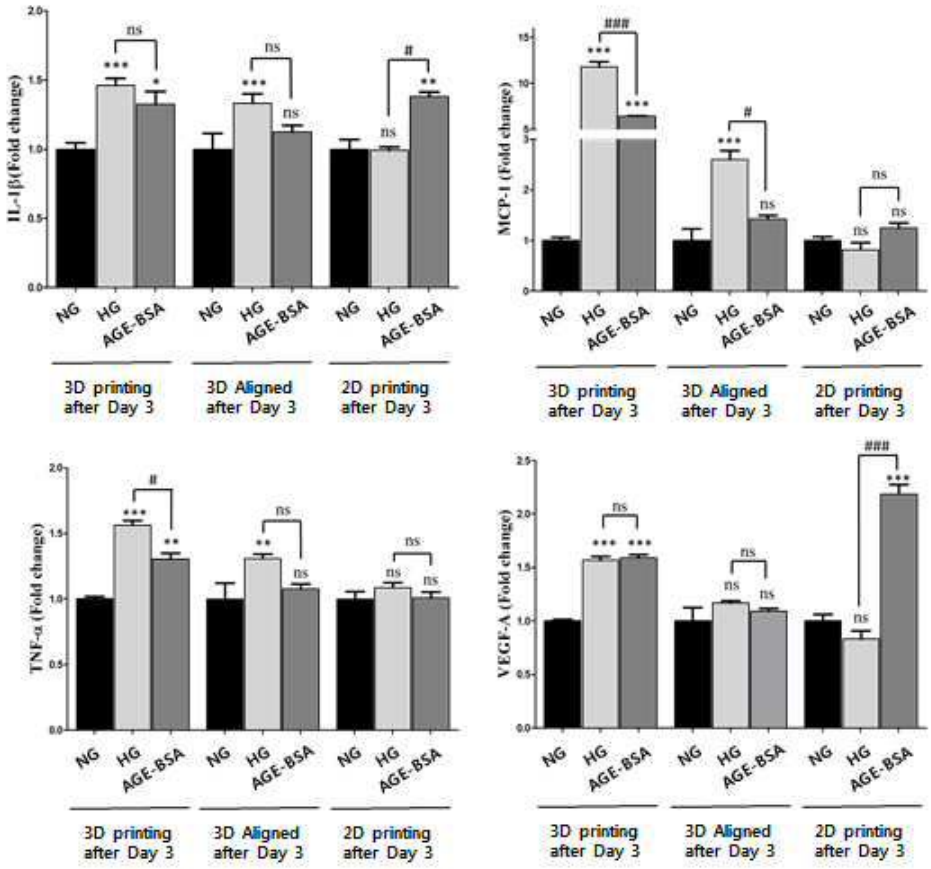
도면10


GS mRNA Expression(3D)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
NG
HG
Kir4.1 mRNA expression(3D)
1.5
1
0.5
0
**
NG
HG
GFAP mRNA Expression(3D)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
***
NG
HG
Vimentin mRNA expression(3D)
2
1.5
1
0.5
0
**
NG
HG
RAGE mRNA Expression(3D)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
NG
HG

도면11


GS
ns
***
Relative GS levels
2D NG
2D HG
3D NG
3D HG
Kir4.1
ns
***
Relative Kir 4.1 levels
2D NG
2D HG
3D NG
3D HG
GFAP
*
***
Relative GFAP levels
2D NG
2D HG
3D NG
3D HG
RAGE
**
**
Relative RAGE levels
2D NG
2D HG
3D NG
3D HG
Vimentin
**
**
Relative Vimentin levels
2D NG
2D HG
3D NG
3D HG

도면12



서 열 목 록

<110> Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Structure for retinal cell culture using 3D bioprinting and Uses thereof

<130> PN190292

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GS_Forward

<400> 1

tgggagcaga cagagcctat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GS_Reverse

<400> 2

caggaatggg cttaggatca 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kir4.1_Forward

<400> 3

caaggacctg tggacaacct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kir4.1_Reverse

<400> 4

gggattcaag ggagaagagg 20

<210> 5

<211> 20

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFAP_Forward

<400> 5

acatcgagat cgccacctac 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFAP_Reverse

<400> 6

atctccacgg tcttcaccac 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vimentin_Forward

<400> 7

ccctcacctg tgaagtggat 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vimentin_Reverse

<400> 8

ttccagcagc ttcctgtagg t 21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAGE_Forward

<400> 9

ctacctattc ctgcagcttc 20

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RAGE_Reverse

<400> 10

ctgatgttga caggagggct ttcc 24

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin_Forward

<400> 11

agagctacga gctgcctgac 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin_Reverse

<400> 12

agcactgtgt tggcgtacag 20