

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0117144
(43) 공개일자 2021년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/38 (2006.01) *C12M 1/42* (2017.01)*C12M 3/00* (2006.01) *C12N 13/00* (2017.01)*C12N 5/077* (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/3852 (2013.01)*A61L 27/3817* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0009580

(22) 출원일자 2021년01월22일

심사청구일자 2021년01월22일

(30) 우선권주장

1020200033429 2020년03월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은아

서울특별시 강동구 올림픽로98가길 47, 1110호(암사동, 중앙하이츠아파트)

오동인

서울특별시 노원구 중계로8길 103, 115동 808호(중계동, 현대그림중계동주택조합2차(아))

(74) 대리인

특허법인 하나

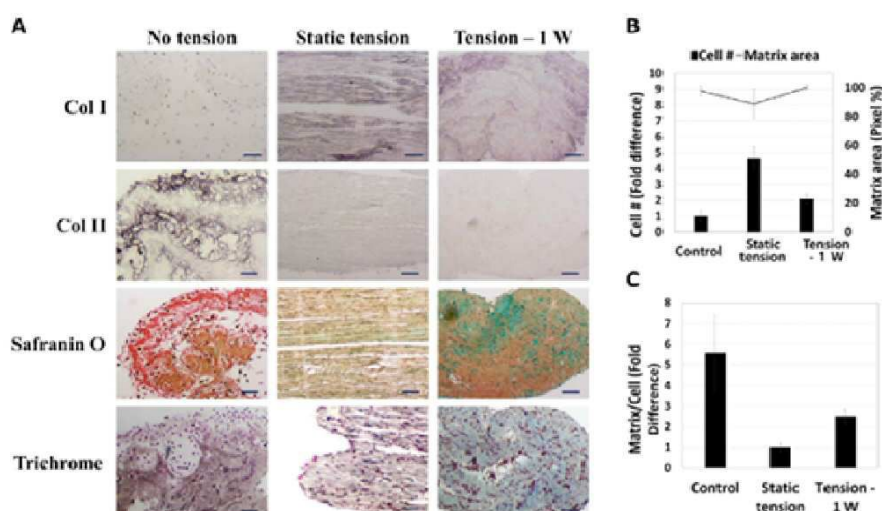
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 인장자극을 이용한 섬유연골 제조방법

(57) 요약

본 발명은 섬유연골 제조방법 및 이의 방법으로 제조된 섬유연골에 관한 것이다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/3856 (2013.01)
A61L 27/3895 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)
C12M 35/04 (2013.01)
C12N 13/00 (2013.01)
C12N 5/0655 (2013.01)
A61L 2430/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030462
과제번호	HI18C2435010020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발(R&D)
연구과제명	다중물성 조직공학체제 체외배양기술과 자기공명 전자기물성영상에 의한 비파괴적
기능성 평가도구 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.10.01 ~ 2022.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345319960
과제번호	2018R1D1A1A02047934
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	세포 표면개질이 줄기세포의 특성변화 및 세포 내 신호전달과정에 미치는 영향 확인
을 통한 세포치료제의 기능향상 기술개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

인장자극하에서 활액막 세포, 연골세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 섬유연골 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인장자극은 3일 내지 10일동안 인가되는 것인, 섬유연골 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 인장자극은 5% 내지 20%의 힘으로 가해진 것인, 섬유연골 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인장자극 하에서의 세포를 배양한 후,

인장자극을 해제하고 상기 세포를 10일 내지 28일 동안 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 섬유연골 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 섬유연골은 척추사이원반, 두덩사이원반 및半月상 연골로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 섬유연골 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 연골세포는 관절연골세포, 늑연골세포 및半月상 연골세포로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 섬유연골 제조방법.

청구항 7

제1항의 방법에 의해 제조된 섬유연골.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유연골 제조방법 및 이의 방법으로 제조된 섬유연골에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 관절염(degenerative arthritis)은 관절 연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환으로서 골관절염(osteoarthritis) 또는 골관절증이라고도 한다. 퇴행성관절염은 만성관절염의 하나로, 체중부하를 많이 받는 관절 연골에서 퇴행성 변화가 일어나 관절면의 뼈가 과잉 성장되어 발생하는 질환이며, 중장년기 성인에게 많이 나타난다. 이 질환은 먼저, 연골 조성 성분을 만들어내는 연골세포가 노화로 인해 기능이 떨어지면서 연골이 탄력성을 잃게되며, 시간이 흐르면서 연골의 표면이 거칠어지고, 관절막으로 싸여진 관절강 내부로 여러 종류의 물질이 유입되어 염증이 생기게 된다. 임상적으로는 반복적인 동통, 관절의 강직감, 관절의 점진적인 운동장애 등이 나타난다.

[0003] 관절연골의 퇴행성 변화의 원인은 아직 규명되어 있지는 않지만, 연골세포 수의 절대적 감소와 연골세포(chondrocytes)에서 일어나는 연골기질 합성과 분해의 불균형이 하나의 원인으로 알려져 있다. 따라서 관절연골의 퇴행성 변화는 연골기질의 분해로 인하여 연골 강도와 쿠션으로서의 능력이 감소되는 것으로 나타난다.

[0004] 현재 임상적으로 사용되고 있는 퇴행성 관절염의 치료로는, 약물치료제(진통제, 스테로이드제, 비스테로이드계 항염제 등), 연골보호제(히알루론산, 글루코사민, 콘드로이틴 등)를 이용하거나 수술적 처치(관절경 수술, 경골 근위부 절골술, 관절부분 치환술 등)에 의한다. 그러나 약물 치료제의 경우는 통증이나 염증 반응 자체를 비특이적으로 완화시키는 효과만을 가지며, 연골보호제는 단지 연골세포에 영양을 공급해 주거나 추역을 완화시킴으로써 일시적으로 관절을 보호해 주는 역할을 할 뿐이다. 또한 절제술과 같은 수술적 처치의 경우, 부분 또는 전 절제술로 주로 기계적인 증상을 없애 급성기의 통증을 개선할 수 있지만, 장기적으로 퇴행성 변화를 초래하여 관절염의 진행을 막지 못한다는 한계가 있고, 봉합술의 경우 적응증이 매우 제한되어 있고, 적지 않은 실패율이 보고되고 있다.

[0005] 이러한 현존하는 퇴행성 관절염 치료 방법의 한계를 극복하기 위하여 조직 공학적인 기법을 이용한 연골 치료법이 대두되고 있으며, 이에 이식 가능한 조직을 체외에서 배양하여 생체조직과 유사도가 높게 구현되는 조직공학 체제에 대한 연구와 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0970598호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 섬유연골 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 섬유연골을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 측면은 인장자극하에서 활액막 세포, 연골세포 및 중간엽 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 섬유연골 제조방법에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에서, “활액막 세포(synovial cell)”는 활액막에 존재하는 세포군을 의미하며, 활액막-유래 세포(synovium-derived cells)와 동일한 의미로 혼용될 수 있다. 상기 활액막은 관절연골에 가장 근접해 있는 조직으로 연골손상 복구를 위해 활액막으로부터 세포들이 리크루팅된다는 보고가 있으며(Hunziker EB, Rosenberg LC, Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. The Journal of bone and joint surgery. 1996 May;78(5):721-33), 더욱이 연골중증과 같은 악성 상태에서 유리연골을 생성할 수 있는 유일한 조직이다. 이는 연골조직 복구를 위해 활액막 세포를 활용할 수 있음을 시사한다.

[0011] 본 발명에서, “연골세포(chondrocytes)”는 간충직세포(mesenchymal cell)로부터 분화하여 연골조직을 형성하는 세포로, 관절연골세포, 늑연골세포, 반월상 연골세포 등을 포함한다. 상기 연골세포는 연골 내부에서 연골기질을 합성하고 분비하는 기능을 수행하며, 이들이 모여 섬유연골을 구성하는 것으로 알려져 있다.

[0012] 본 발명에서, “중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)”는 부착성 성질을 가지는 성체줄기세포의 한 종류로 연골세포, 골세포, 지방세포 및 근육세포 등으로 분화할 수 있는 다분화능을 가진 줄기세포이다. 상기 재생력이 풍부한 중간엽 줄기세포의 연골세포의 분화능을 이용하여, 섬유연골 형성에 활용할 수 있다.

[0013] 본 발명에서, “섬유연골”은, 성질과 모양에 따라 종류가 나뉘는데 연골 중 하얀 섬유성 조직과 연골성 조직이 다양한 비율로 섞여있는 연골이며, 인대나 힘줄이 관절에 부착하는 부위를 말한다. 상기 섬유연골은 척추체, 치골, 무릎 사이의 척추사이원반, 반월상 연골, 두덩사이원반 등의 다양한 형태로 위치하고 있으며, 콜라겐으로 이루어진 단단한 섬유질로 압박에는 강하지만 잘 찢어지고 치밀하게 엮인 상태로 배열되어 있으며, 초자연골이

나 결합조직과 연결되어 존재한다.

- [0014] 본 발명에서 “척추사이원반”은 두 척추체의 사이에 존재하는 섬유연골로서, 사람에게서는 23개의 척추사이원반이 존재한다. 탄력성이 있어, 등뼈에 유연성을 주고 충격을 흡수하는 쿠션의 역할을 한다. 무리한 충격이 가해지거나 노령화에 이어 탄력성이 없어질 경우, 척추사이원반의 섬유연골이 으깨져 비어져 나올 수 있으며, 이러한 질환을 추간판ヘルニア('디스크'로도 지칭됨)라고 한다.
- [0015] 본 발명에서 “반월상 연골”은 무릎 관절에 일반적으로 존재하는 연골로서, 췌기 모양의 연골로 대퇴골과 경골 사이에서 완충 장치 역할을 하는 구조물이다. 이러한 반월상 연골은 관절을 보호해주는 역할을 한다.
- [0016] 본 발명에서 “두덩사이원반”은 두덩 결합에서 양쪽 두덩뼈 사이를 연결하는 섬유연골로 이루어진 원반을 일컫는다. 두덩뼈는 엉덩관절에 존재하는 뼈로, 두개의 두덩뼈가 중간선에 위치해 있을 수 있도록, 두덩사이원반 섬유연골이 단단히 결합되어 있다.
- [0017] 종래 상기 섬유연골 조직을 형성하기 위하여 스캐폴드, 합성고분자, 생체기질 등을 이용하였으나, 지지체 없이 세포만으로 섬유연골조직 구조체를 형성하는 방법은 보고된 바 없다. 이는 체외배양에 의해 형성된 연골조직이 체내 연골조직과 동일한 기능성을 기대하기 위해서는 1형 콜라겐의 높은 발현량, 단방향성 조직배향성(uniaxial anisotropic tissue alignment) 및 연골특이적 기질 발현의 조직학적 특징이 모두 구현되어야 하기 때문이다.
- [0018] 특히, 인장자극을 가하는 경우, 연골성 기질 형성이 억제됨에 따라 섬유연골조직의 형성이 어려운 문제가 있었다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에서는 인장자극 인가 후 YAP 단백질의 핵 편재 경향성이 증가하였으며, 연골세포 분화 마커인 Sox-9의 발현량이 현저히 감소됨을 확인하였다(도 2 및 도 3). 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 YAP 단백질의 핵 내 이동을 억제하는 물질을 처리한 결과, Sox-9의 발현량이 다시 증가함을 확인하였다(도 4).
- [0020] 상기와 같은 결과로부터 인장자극을 인가할 경우, YAP 단백질의 핵 내 이동이 촉진되고 이에 따라 연골세포의 분화능이 억제됨으로써 연골성 기질 형성능이 저하됨을 확인하였다.
- [0021] 이에 따라, 본 발명에서는 연골형성 억제가 인장자극에 의한 YAP 단백질의 핵 내 이동 촉진으로부터 기인한 것임을 확인하고, 인장자극 정도 및 기간을 조절하여 다양한 배양 조건에서의 실험을 수행함으로써 섬유상 기질 형성능을 유지하면서도, YAP 단백질의 핵 내 이동을 억제하여 연골성 기질 형성능을 향상시킬 수 있는 방법을 개발하였다.
- [0022] 구체적으로 상기 인장자극은 3일 내지 10일 동안 인가되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 7일 내지 10일 동안 인가되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에서는 3일 이상 인장자극이 인가된 경우 연골의 형태가 형성되고 인장 자극을 해제하더라도 배향성이 유지되는 것을 확인하였으며, 7일 이상 인장자극이 인가된 경우, 인장자극이 해제된 후에도 5일 이상 형태 및 한방향성 조직배향성이 유지되는 것을 확인하였다(도 8 및 도 9).
- [0024] 또한, YAP 단백질의 비가역적인 핵 편재 경향성을 막기 위해서는 10일 이내로 인장 자극이 가해지는 것이 유효함을 확인하였다(도 10).
- [0025] 즉, 본 발명에서는 인장자극을 가함으로써 섬유연골이 형성되고 형태가 유지될 수 있음을 확인하였으며, 나아가 인장자극 기간을 조절함으로써 YAP 단백질의 핵 내 편재하는 경향성을 억제시킬 수 있는 가능성을 확인하였는바, 스캐폴드 등 특별한 지지체 없이도 효과적으로 섬유연골을 형성, 제조할 수 있다.
- [0026] 구체적으로 상기 인장자극은 5% 내지 20%의 힘으로 가해지는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 5% 내지 15%, 가장 구체적으로는 10% 내지 15%의 힘으로 가해지는 것일 수 있다.
- [0027] 또한 구체적으로, 상기 인장자극 하에서의 연골세포를 배양한 후, 인장자극을 제거하고 연골세포를 10일 내지 28일 동안 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 연골분화배지에서 14일 내지 21일 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에서는 5~20%의 인장자극을 인가한 상태에서 배양하였을 때 조직이 형성됨에 따라 두께가 두꺼워지는 것을 확인하였다(도 12 및 도 13). 또한 5~10%의 인장자극을 가한 경우 조직의 두께가 두꺼워지면서도 조직 전체에서 일관성 있는 조직 배향성이 더욱 잘 나타났으며, 15% 이상의 인장자극에서는 조직 전체의 길이 증가를 감안할 때 조직형성의 증가와 함께 고도의 조직 배향성이 나타남을 확인하였다(도 14).

- [0029] 본 발명의 일 실시예에서는 인장자극을 인가한 후 해제한 상태로 연골분화배지에서 3주간 배양한 결과, 섬유연골이 형성됨을 확인하였다. 반면, 3 주간 지속적으로 인장자극을 인가한 경우에는 섬유연골이 형성되지 않음을 확인하였다(도 15).
- [0030] 상기 결과는 인장자극을 일정기간 지속할 경우에는 YAP 단백질의 핵 내 이동이 지속적으로 나타남으로써 연골성 기질 형성능이 억제되어 섬유연골 형성이 어려울 수 있으나, 5일 내지 10일 정도 일시적으로 자극시킨 후 해제하여 배양할 경우에는 조직배향성을 유지하면서도 YAP 단백질의 핵 내 이동을 막을 수 있음을 시사한다.
- [0031] 상기 방법은 연골세포 분화 억제를 감소시킬 수 있다. 즉 연골성 기질 형성능을 향상시킬 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서는 인장자극을 인가한 후 인장자극을 해제하고 연골분화 배지에서 배양한 결과, 높은 조직배향성이 유지됨을 확인하였으며(도 16), 1형 콜라겐의 합성량 및 2형 콜라겐의 합성량이 모두 증가함으로써 섬유상 기질 및 연골성 기질이 모두 형성될 수 있음을 확인하였다(도 17).
- [0033] 상기 결과에 따라, 본 발명은 인장자극 정도 및 기간을 조절하여 연골세포를 배양함으로써, 종래 인장자극에 의한 연골세포 분화 억제 문제를 해결하고, 섬유상 기질 및 연골성 기질 형성능이 우수한 섬유연골 조직을 형성할 수 있다.
- [0034] 구체적으로, 상기 섬유연골 조직은 척추사이원반, 두덩사이원반 및 반월상 연골로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 또한 구체적으로, 상기 연골세포는 중간엽 줄기세포, 관절연골세포, 늑연골세포 및 반월상 연골세포로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 섬유연골 조직 형성에 활용 가능한 연골세포는 모두 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 방법에 의해 제조된 섬유연골에 관한 것이다.
- [0037] 상기 “섬유연골” 및 “섬유연골 제조방법”에 관한 설명은 전술한 바와 동일하다.
- [0038] 상기 섬유연골은 척추사이원반, 두덩사이원반 및 반월상 연골로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 다만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 방법에 의해 제조된 섬유연골조직은 조직배향성 및 연골성 기질 형성능이 모두 우수함을 확인하였다(도 8 내지 도 17).

발명의 효과

- [0040] 본 발명의 섬유연골 제조방법은 체외배양을 통해 생체유사성이 높은 섬유연골 조직을 형성할 수 있으므로, 조직 재생 및 섬유연골 재건을 위한 이식에 활용할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 인장자극을 인가한 처리군과 인가하지 않은 대조군을 배양하여 형성된 조직의 특성을 나타내는 것이다.
- 도 2는 인장자극 인가 후의 YAP 단백질의 핵 편재 경향성 확인 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 인장자극 인가 후의 Sox-9의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 YAP 단백질의 핵 내 이동 억제제 처리에 따른 Sox-9 발현 증가 여부 확인 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 인장자극을 인가한 그룹에 YAP 단백질의 핵으로의 이동 억제제 처리 시, 연골 기질 형성능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 표면 경도에 따른 YAP 단백질의 세포질로 이동 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다
- 도 7은 정적 인장 챔버(static tension chamber) 구조를 나타낸 것이다.
- 도 8은 인장자극을 인가한 뒤, 인장 해제 후의 조직배향성 유지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 인장자극을 인가한 뒤, 인장 해제 후의 세포 골격(actin cytoskeleton) 및 1형 콜라겐(type I

collagen)의 형광염색 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 인장자극을 인가한 뒤, 인장 해제 후의 YAP 단백질의 핵 편재 경향성 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 5%~20%의 인장자극을 인가하면서 배양하는 기간 및 조건을 모식도로 나타낸 것이다.

도 12는 5%, 10%, 15%, 20%의 인장자극을 인가하며 배양한 조직의 육안사진을 비교하여 배양 주차 별 조직 두께 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 인장자극 인가조건 별로 시간에 따른 조직 두께의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 연골분화 유도 3주 후 얻은 조직의 기질 특성을 확인하기 위하여 Safranin O, Trichrome, H&E 염색을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 15은 인장자극의 일시적(7일) 인가, 지속적 인가 또는 아예 인가하지 않은 경우 섬유연골 형성이 가능한지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16는 인장자극의 일시적(7일) 인가, 지속적 인가 또는 아예 인가하지 않은 경우 조직배향성 유지 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 인장자극의 일시적(7일) 인가, 지속적 인가 또는 아예 인가하지 않은 경우의 섬유상 기질 및 연골성 기질 형성 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1. 인장 인가에 따른 조직배향성 및 연골성 기질 형성 여부 확인

[0045] 1-1. 인장자극 인가에 따른 조직배향성 및 연골성 기질 형성 여부 확인

[0046] 섬유연골인 반월상 연골에서 얻은 연골세포를 시트형태로 배양한 뒤 10%의 정적 인장(static tension)을 인가한 처리군과 인가하지 않은 대조군을 각각 성장배지(2mM L-glutamine, 10^{-4} M ascorbic acid, 10^{-8} M Dexamethasone, 1ng/ml rhFGF-2, 5% Fetal bovine serum을 포함하는 alpha-MEM) 및 연골분화배지(1M proline, 0.3mM ascorbic acid, 10^{-7} M dexamethasone, 10 ng/ml TGF-3, 1x ITS+3를 포함하는 DMEM)에 차례로 배양하여 형성된 조직 특성을 확인하였다.

[0047] 먼저, 1형 콜라겐의 배열 및 합성량을 확인하기 위하여, 1형 콜라겐에 대한 항체(Chemicon, 제품번호 AB755P)를 이용한 면역염색을 수행하였으며, 트릭롬 염색은 L G Luna 문헌에(Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts, Johnson Printers, Downers Grove, IL P151-152 c 1992) 기재된 방법을 참고하여 수행하였다.

[0048] 또한 상기 배지에서 배양된 세포를 4% 파라포름알데히드를 이용하여 고정한 뒤, 고정된 세포를 파라핀 절단한 후 자일렌을 이용하여 탈파라핀화하였다. 그 후, 바이게르트 헤마톡실린(Weigert's hematoxylin)을 이용하여 5분간 핵 염색하여 주고, 증류수를 이용하여 10분간 세척하였다. 10분 후 1% HCl 포함 70% 알코올 용액을 이용하여 린스한 후 0.02% 수성 패스트 그린(aqueous fast green)으로 5분간 염색하였다. 패스트 그린 염색 후 1% 아세트산으로 세척하고, 0.1% 수성 사프란인 O(aqueous safranin O)를 이용하여 5분간 염색하였다. 사프란인 O 염색 후 알코올에 2~3회 담갔다 뺀 후 자일렌에 넣어 마운팅(mounting)하였다.

[0049] 그 결과, 인장자극을 인가한 경우 높은 조직배향성이 유도되었으며 섬유상기질인 1형 콜라겐의 배열 정도 및 합성량이 모두 증가함을 확인하였으며, 한편 인장자극을 처리한 군에서는 연골성 기질 형성이 전혀 관찰되지 않음을 확인하였다(도 1).

[0050] 1-2. 연골성 기질 형성 억제 신호 인자 확인

[0051] 인장자극이 세포질에 존재하는 YAP 단백질의 핵 이동 현상을 유도하는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 1-1에서 배양된 처리군에 면역 형광법(Immuno-Fluorescence, IF)를 수행하였다.

[0052] 구체적으로, 상기 세포에 3.7% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 첨가하여 상온에서 20분간 고정하였다. 그 후, PBS로 3번 세척하였고 세포의 투과성을 높이기 위해 0.1% Triton-X100을 15 분간 처리하였

다. 다시 PBS로 3번 세척한 후, 10% FBS (fetal bovine serum)을 1시간 처리하였으며, anti-YAP 항체를 10% FBS에 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시키고 1% FBS로 10분씩 3번 세척한 후 2차 항체를 10% FBS에 희석하여 암실에서 2시간 반응시키고 1% FBS로 10분씩 3번 세척하였다. 이 때, 2번째 세척시 300 ng/ml DAPI를 1% FBS에 넣어주었다. 그 다음, 슬라이드 글라스에 봉입용액을 떨어뜨린 후 커버글라스로 덮었다. 주변의 봉입용액을 제거하고 에나멜로 덮은 후 현미경으로 관찰하였다.

[0053] 또한, 연골분화 마커 Sox-9의 발현 정도를 조사하기 위하여 Semi-quantitative PCR (30 cycles optimum)을 수행하였다. 구체적으로 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 서열을 이용하였으며, 유전자 발현 값의 정규화를 위해 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 발현 수준을 이용하였다.

표 1

서열번호	프라이머	서열(5'-3')
1	Sox-9 forward	CTCCGACACCGAGAATACAC
2	Sox-9 reverse	CCATTCTTCACCGACTTCCT
3	GAPDH forward	TCACCATCTTCCAGGAGCGA
4	GAPDH reverse	CACAATGCCGAAGTGGTCGT

[0055] 그 결과, 3주 동안 인장자극을 유지한 채 배양 시 핵으로 이동되어 있는 YAP 단백질의 양이 현저히 증가함을 확인하였다(도 2).

[0056] 또한, 성장배지 조건에서는 기본수준의 Sox-9 발현량이 나타나며, 연골분화배지 조건에서는 대조군 및 처리군 모두 Sox-9 발현이 증가함을 확인하였다. 다만, 연골분화 조건에서 처리군의 경우 대조군에 비해 Sox-9 발현 감소가 관찰되었다(도 3).

[0057] 상기 결과는 인장자극에 의한 YAP 단백질의 핵 내 편재는 Sox-9 발현 조절에 영향을 줌으로써 연골성 기질 형성이 저하되는 것임을 시사한다.

[0058] 1-3. YAP 단백질의 핵으로의 이동 억제제 처리시, 연골형성능 확인

[0059] YAP 단백질의 핵으로 이동을 억제하는 베르테포르핀(verteporfin) 처리시, 연골분화 마커인 Sox-9 발현 증가 여부를 확인하였다. Sox-9 발현량 측정 방법은 1-2와 동일한 방법으로 측정하였다.

[0060] 또한, 베르테포르핀 처리 후 얻은 연골 조직을 파라핀으로 포매하여 5-7 μ m 두께로 절편 후 건조시킨 뒤, 헤마톡실린/에오신 염색(H&E, Hematoxylin & Eosin staining)을 수행하였다. 염색된 조직을 고해상도 광학현미경으로 관찰하였다.

[0061] 그 결과, 베르테포르핀 처리시 연골분화 마커 Sox-9 발현이 현저하게 증가함을 확인하였으며, 이는 YAP 단백질의 핵으로의 이동 억제에 따라 연골 분화능이 높게 발휘될 수 있음을 시사한다. 한편, 인장자극을 인가한 처리군에 베르테포르핀 처리 시 조직 구조체의 전반적인 기질 형성능이 증가되는 반면 섬유상 기질의 형성은 감소하는 양상을 나타냈으며, 이는 YAP 단백질의 이동을 억제하는 것만으로는 효과적인 섬유연골형성 조건을 수립하지 않음을 시사한다.

[0062] 상기 결과를 통해, 인장자극을 인가하는 경우 이동방성(tissue anisotropy) 방향에 따라 섬유상 기질을 형성할 수는 있으나, YAP 단백질의 핵 내 이동을 촉진시킴으로써 연골성 기질 형성이 억제되어 섬유연골조직 형성이 어려움을 확인하였다.

[0063] 실시예 2. 이동방성(tissue anisotropy)이 유지되는 인장 인가 조건 탐색

[0064] 2-1. YAP 단백질의 핵으로의 이동 억제 조건 확인

[0065] YAP 단백질의 핵 편재 경향에 따른 연골분화 억제 영향을 제거하기 위한 조건을 확인하였다. 먼저, 플라스틱 배양접시로부터 세포 시트를 떼어낸 후 세포-세포 접촉(cell-cell contact)만 유지되도록 하였다. 하루 지난 후 상기 실시예 1-2의 방법과 동일한 방법으로 YAP 단백질의 세포 내 분포를 확인하였다.

[0066] 그 결과, YAP 단백질의 이동을 유발하는 자극이 사라지면 단시간의 YAP의 편재가 조정되어 세포질에 분포하게 됨을 확인하였다(도 6). 이는 YAP에 의한 연골분화 억제를 막을 수 있음을 시사한다.

- [0067] 2-2. 인장자극 인가 후 인장 해제 시 조직배향성 유지 여부 확인
- [0068] 상기 2-1의 실험 결과를 토대로, 인장자극을 1일 내지 10일 동안 인가하고, 이후 인장 해제 후에도 조직배향성이 유지되는지 확인하였다.
- [0069] 먼저, 시트형태로 배양된 연골세포를 길게 말아 cell cable을 형성하고, 도 7에 설계된 정적 인장 챔버(static tension chamber)를 이용하여 10% 인장자극을 1~10일 동안 인가하였으며, 1일 3일, 7일, 10일 후의 조직배향성 유지여부를 확인하였다. 인장자극 인가 후, 조직배향성 유지 정도를 면밀하게 평가하기 위하여 팔로이딘(phalloidin) 염색법을 이용한 세포 골격(actin cytoskeleton)의 배열 형태를 확인하였으며, 상기 1-1의 방법과 동일한 방법으로 1형 콜라겐을 형광염색하여 세포외기질의 배열 형태를 확인하였다.
- [0070] 조직형태에 대한 육안 관찰 결과, 3일 이상 인장자극을 인가한 경우 형태가 생성되고 조직배향성이 유지되며, 7일 이상 인장자극이 인가된 경우, 인장자극이 해제된 후에도 5일 이상 형태가 유지되는 것을 확인하였다(도 8).
- [0071] 세포 골격과 세포외기질의 배열 형태를 기반으로 조직 배향성의 유지 여부를 판단하기 위하여, 면역형광염색을 이용하여 확인한 결과, 3일간 인장자극 인가 후 인장자극을 해제한 경우에는 5일 후 세포골격과 세포외기질의 배향성이 무질서해진 반면, 7일 이상 인장자극이 인가된 후 인장자극을 해제한 경우에는 5일간 한방향성 조직배향성(uniaxial tissue anisotropy)이 유지됨을 확인하였다(도 9).
- [0072] 2-3. 인장자극 인가 후 인장 해제 시 YAP 단백질의 핵 편재 경향성 확인
- [0073] 상기 2-1의 실험을 토대로, 1일, 3일, 7일, 10일간 인장자극을 인가한 후, 인장 해제 시 YAP 단백질의 핵 내 이동 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 상기 1-2의 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [0074] 그 결과, 모든 인장자극 조건에서 인장자극 해제 24시간 이후, YAP 단백질의 핵 편재 경향성이 현저히 감소됨을 확인하였으며, cell cable 형태에서 인가된 일시적인 인장자극은 YAP 단백질의 핵 내 이동과 관련하여 비가역적 변화를 유도하지 않아, 연골분화 억제 영향이 지속되지 않을 수 있음을 확인하였다(도 10).
- [0075] 상기 결과를 통해, 연골성 기질 형성 초기(5~7일) 조직배향성을 유지하기 위하여 인장자극 인가 기간은 최소 3일을 넘겨야 하며, 한편 YAP 단백질의 비가역적인 핵 편재 경향성을 막기 위해서는 최대 10일 이내로 인장자극을 인가하여야 함을 확인하였다.
- [0076] **실시예 3. 인장조직 인가에 따른 조직형성 확인**
- [0077] 상기 실시예 2의 실험 결과를 토대로 5~20%의 인장자극을 인가한 상태에서 3주간 연골분화 배지를 이용하여 배양하면서 형성되는 연골조직을 확인하였다. 5~20%의 인장자극을 인가하면서 배양한 기간 및 조건은 도 11에 나타난 바와 같다.
- [0078] 3주 동안 형성되는 조직의 두께를 육안으로 관찰하였으며, 그 결과 5~20%의 인장자극 범위 전체에서 시간이 흐를수록 조직의 성장이 증가하는 것을 확인하였다(도 12 및 도 13). 또한, 5~10%의 인장자극을 가한 경우 조직의 두께가 두꺼워지면서도 조직 전체에서 일관성 있는 조직 배향성이 더욱 잘 나타났으며, 15% 이상의 인장자극에서는 조직 전체의 길이 증가를 감안할 때 조직형성의 증가와 함께 고도의 조직 배향성이 나타남을 확인하였다(도 14).
- [0079] 나아가, 상기과 같이 인장자극을 가하여 연골분화를 유도하고 3주 경과 후 수득된 연골조직의 특성을 확인하기 위하여 Safranin O, Trichrome, H&E 염색 후 관찰하였다. 그 결과, 5~20%의 인장자극에서 단방향적 배향성을 갖춘 조직이 형성된 것을 확인하였으며, 특히 5~15%의 인장 자극 범위에서 조직의 배향성이 더욱 일관성 있게 나타난 것을 확인하였다.
- [0080] **실시예 4. 비등방성이 구현된 연골조직 형성 확인**
- [0081] 4-1. 인장자극 후의 섬유연골 형성 확인
- [0082] 상기 실시예 2의 실험 결과를 토대로 7일간 10% 인장자극을 인가한 뒤 섬유연골 형성 여부를 확인하였다.
- [0083] 먼저, 연골세포를 10% 인장자극을 7일간 인가한 처리군을 3주간 연골분화 배지에 배양하여 섬유연골 조직을 형성시켰다. 이후 조직 형성 여부를 현미경으로 관찰하였다.
- [0084] 그 결과, 7일 동안 10% 인장자극 후 인장 해제하여 2~3주간 배양시킨 경우 연골 조직이 형성됨을 확인하였다(도 15).

[0085] 4-2. 인장자극 후의 조직배향성 유지 확인

[0086] 연골 분화 후 조직배향성 유지 정도를 핵이 나타내는 각도를 조사하여 평가하였으며, 이후 현미경으로 배향성이 유지되었는지 여부를 확인하였다.

[0087] 그 결과, 인장자극을 인가하지 않은 경우 특정방향으로의 배향성이 나타나지 않으나, 인장자극을 7일간 처리한 군 또는 3주간 지속적으로 처리한 군에서는 고도로 높은 배향성이 유지됨을 확인하였다(도 16).

[0088] 4-3. 인장자극 후의 연골분화 특성 확인

[0089] 7일간 10% 인장자극을 인가한 뒤 섬유상 기질 및 연골성 기질에 대한 면역염색 및 조직학적 염색을 수행하였다. 상기 실험 방법은 실시예 1-1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행하였으며, 2형 콜라겐 염색은 2형 콜라겐에 대한 항체(AbCam, 제품번호 AB53047)를 이용하여 면역조직염색을 수행하였다.

[0090] 그 결과, 7일간 인장자극 인가 후 해제상태로 배양한 그룹에서는 1형 콜라겐과 연골성 기질 형성이 모두 나타났으며, 세포 당 형성된 세포외기질의 면적이 인장자극 유지군과 비교하여 현저하게 높게 나타남을 확인하였다. 한편 인장자극을 인가하지 않은 대조군에서는 1형 콜라겐의 형성 정도가 매우 낮게 나타났으며, 3주간 지속적으로 인장자극을 인가한 경우에서는 연골성 기질 형성이 거의 나타나지 않았다(도 17).

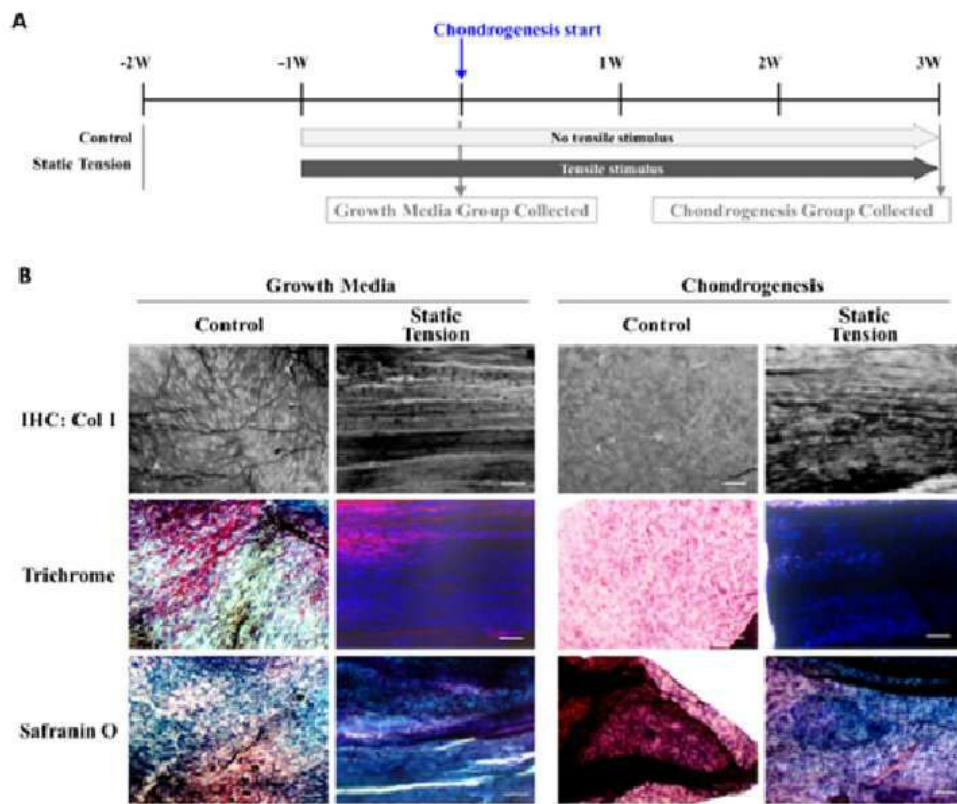
[0091] 상기 결과를 통해, 인장자극 하에서 연골세포를 배양한 후 인장해제 상태로 배양할 경우 섬유상 기질 및 연골성 기질 형성능이 모두 우수함을 알 수 있으며, 이에 본 발명의 방법을 적용하여 연골세포를 배양함으로써 인장강도와 관절 내 인가되는 하중을 견딜 수 있는 압축강도를 동시에 나타낼 수 있는 조직 형성이 가능함을 시사한다.

[0092] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

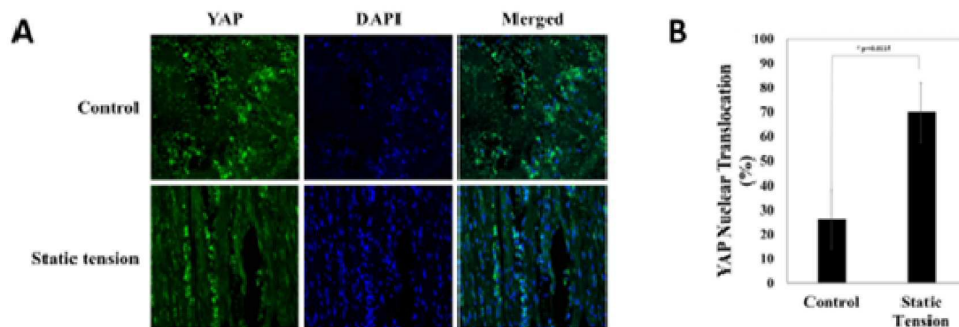
[0093] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

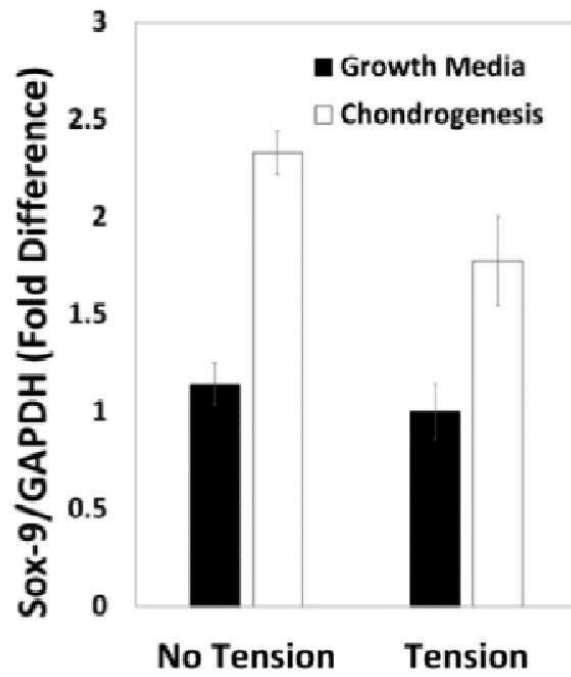
도면1



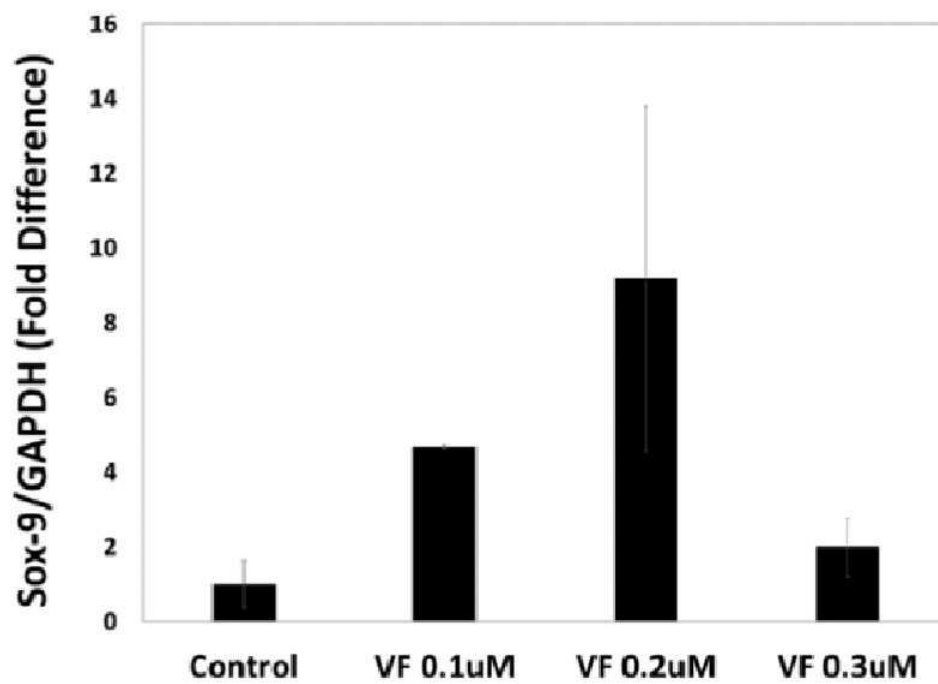
도면2



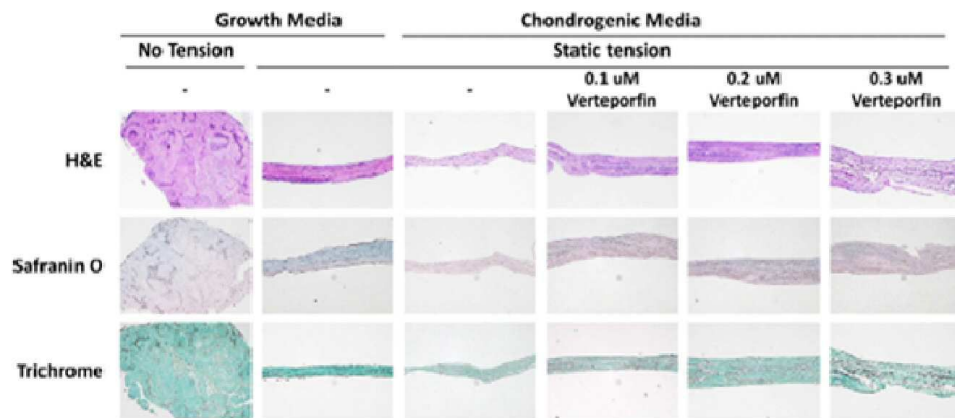
도면3



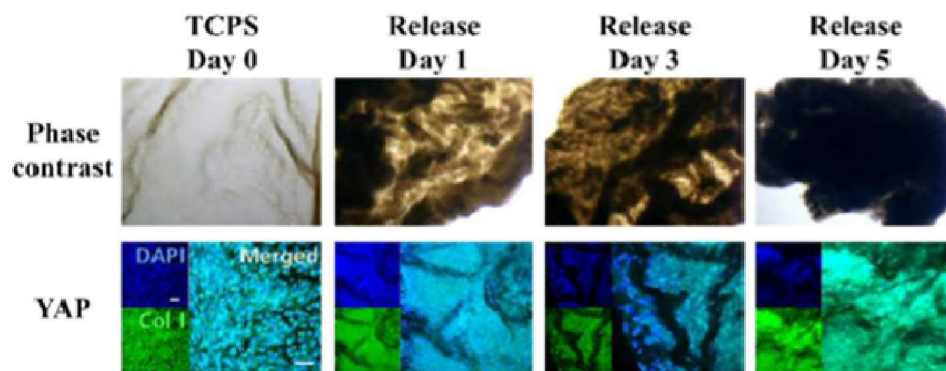
도면4



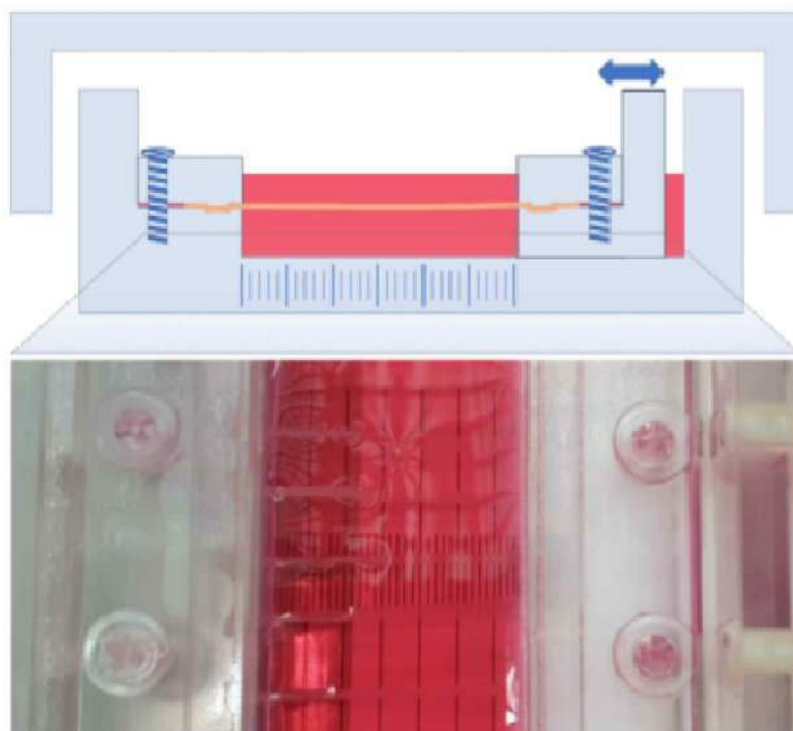
도면5



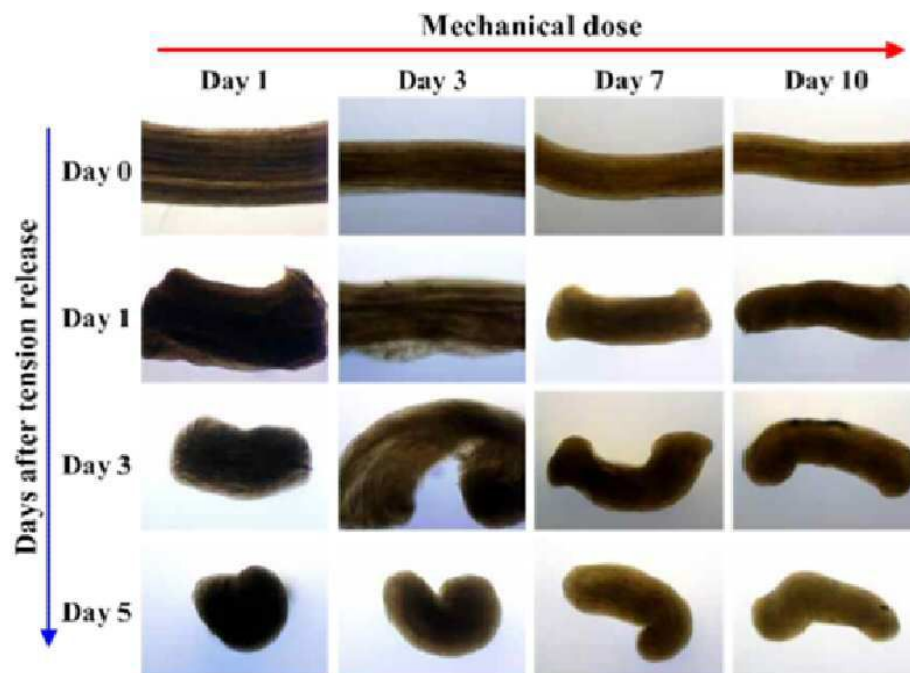
도면6



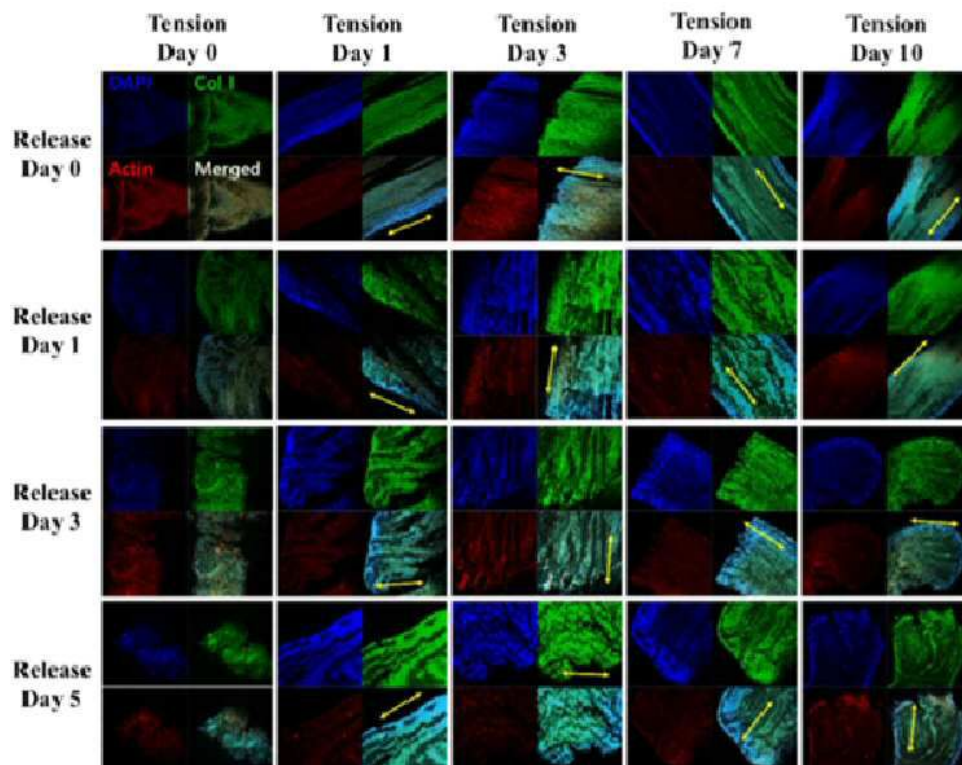
도면7



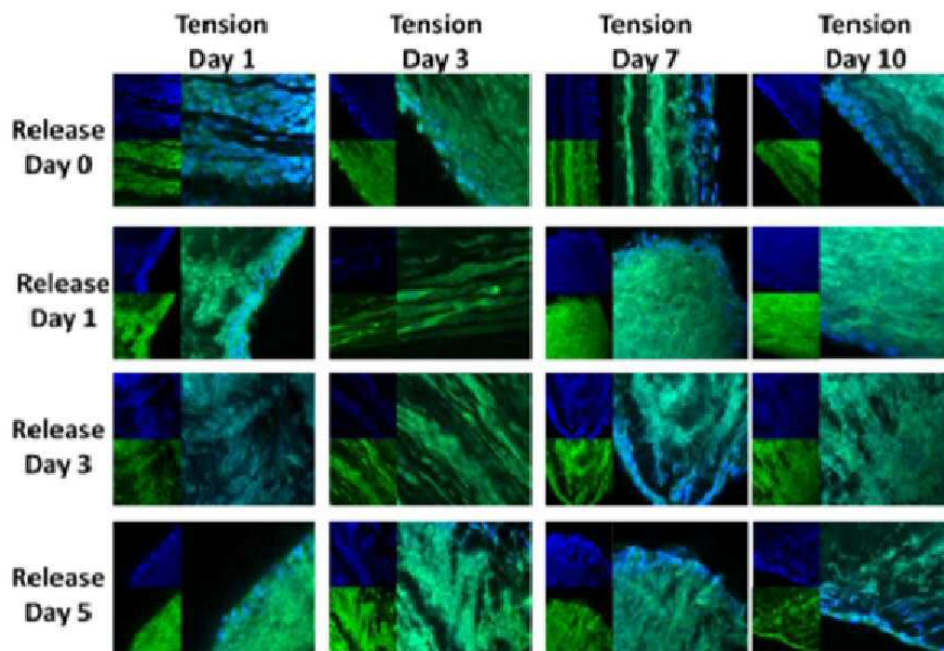
도면8



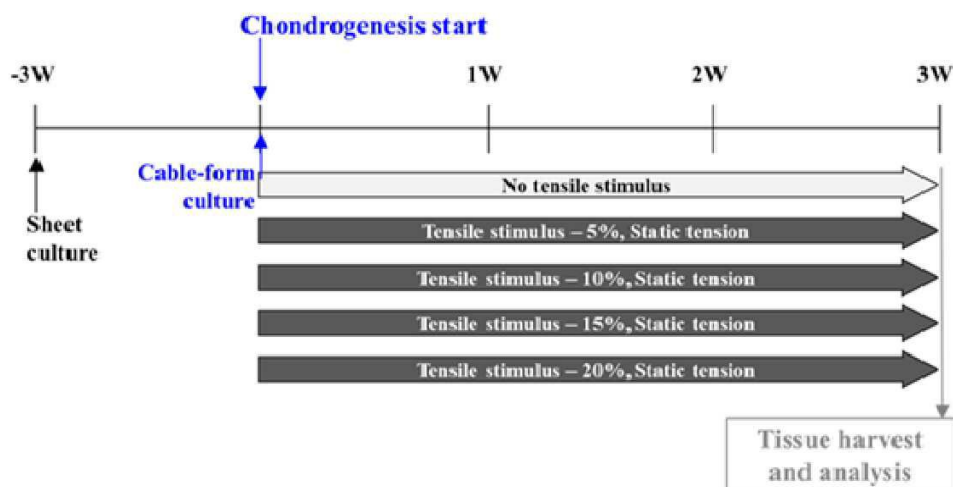
도면9



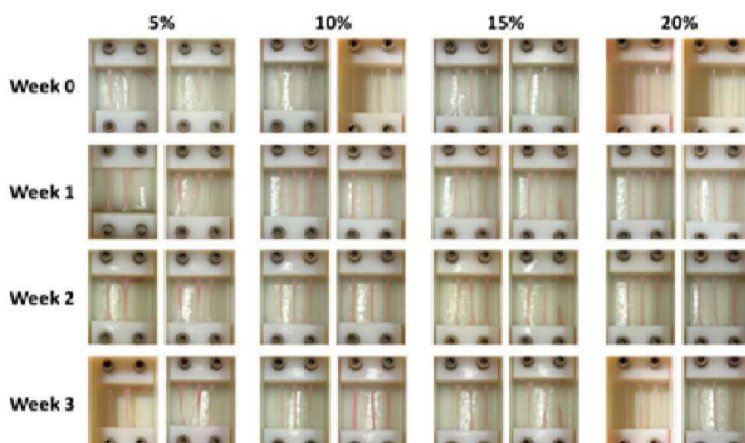
도면10



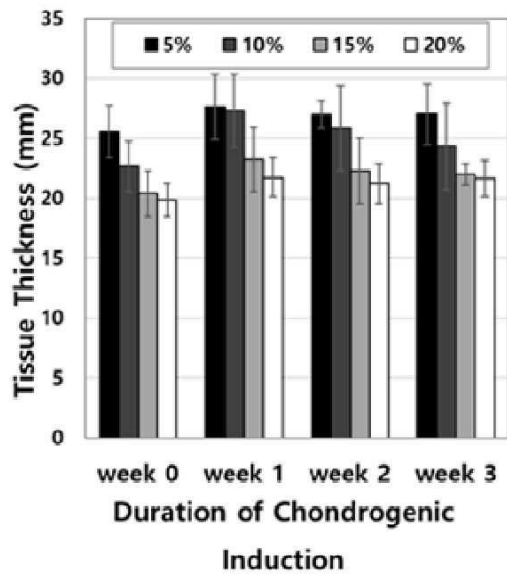
도면11



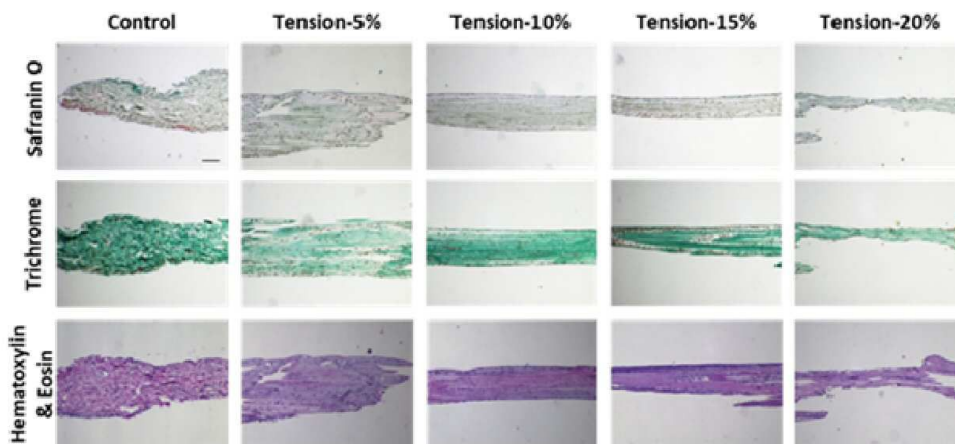
도면12



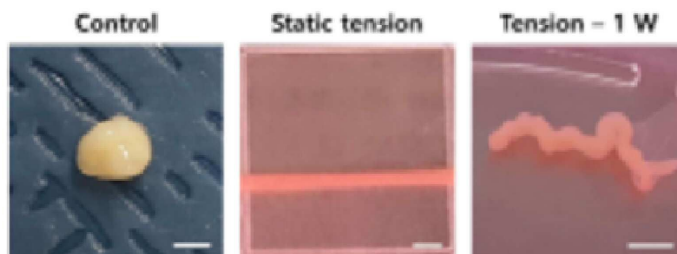
도면13



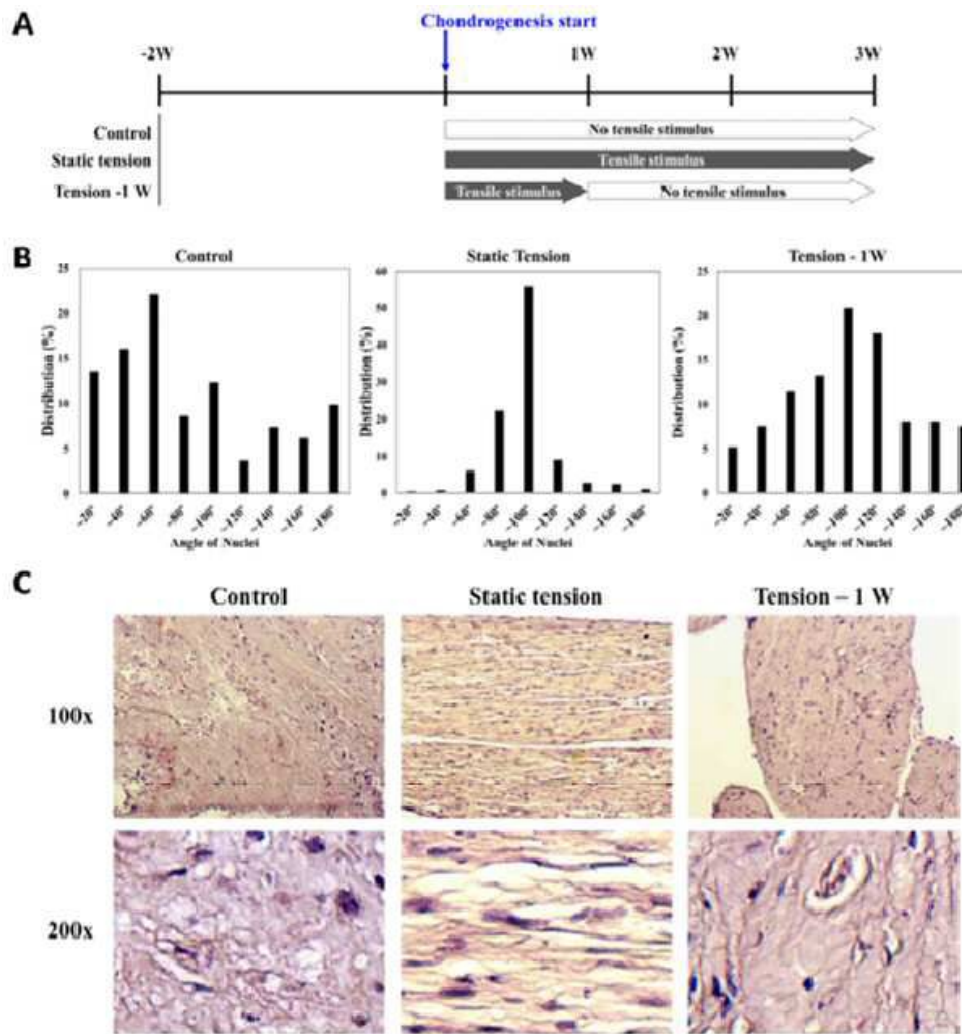
도면14



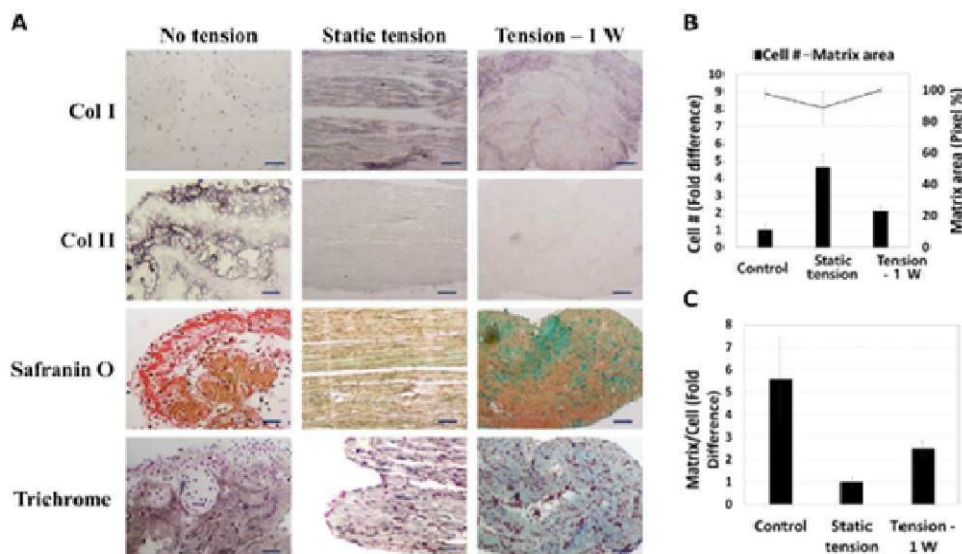
도면15



도면16



도면17



서열 목록

<110>	University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University	
<120>	METHOD FOR FIBROCARILAGE RECONSTRUCTION USING MECHANICAL STIMULATION	
<130>	20PP31190	
<160>	4	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sox-9 forward	
<400>	1	
	ctccgacacc gagaatacac	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sox-9 reverse	
<400>	2	
	ccattcttca ccgacttct	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward	
<400>	3	
	tcaccatctt ccaggagcga	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH reverse	
<400>	4	

cacaatgccg aagtggtcgt

20