

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0035761 (43) 공개일자 2018년04월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/0793 (2010.01) C01G 49/06 (2006.01) C01G 49/08 (2006.01) C12N 13/00 (2017.01) (52) CPC특허분류 C12N 5/0619 (2013.01) C01G 49/06 (2013.01) (21) 출원번호 10-2018-0034143(분할) (22) 출원일자 2018년03월23일 심사청구일자 없음 (62) 원출원 특허 10-2015-0086828 원출원일자 2015년06월18일 심사청구일자 2015년06월18일	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 최정우 서울특별시 용산구 서빙고로 35 (2/9) 용산시티파크 103-603 (한강로3가, 용산시티파크1단지) 조현열 서울특별시 마포구 신수로9길 14 (신수동)93-97 302호 이상율 서울특별시 마포구 신수동 서강대학교 1번지 서강대학교 곤자가 국자학사 B965 (74) 대리인 윤대웅, 공병욱	

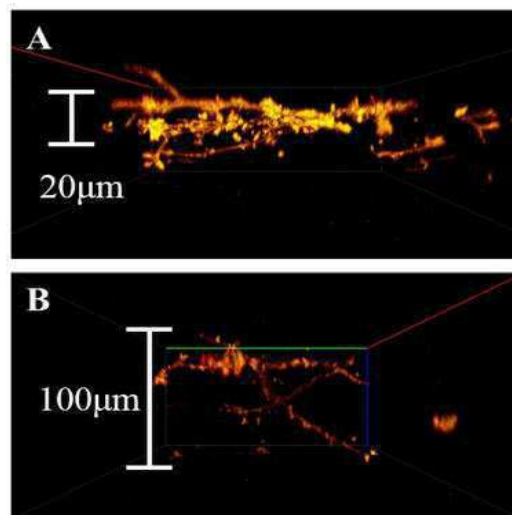
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **신경 세포 수상돌기의 성장 방향 조절 방법**

(57) 요약

본 발명은 신경 세포 수상돌기의 성장 방향 조절 방법 및 상기 방법에 의해 조된 신경 세포 배양물을 제공한다. 본 발명에 따르면, 자성 나노입자 및 자기장을 이용하여 용이한 방법으로 신경 세포의 수상돌기 성장 방향을 제어할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C01G 49/08 (2013.01)

C12N 13/00 (2013.01)

C01P 2004/64 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013K1A4A3055268

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해외우수연구기관유치사업

연구과제명 서강-하버드 질병 바이오펠리 연구 센터

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A10051725

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업(전략)

연구과제명 뇌질환 약물 스크리닝 기능 나노구조체 기반 뇌 기저핵칩

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 신경 세포 수상돌기의 성장 방향 조절 방법:

- (a) 자성 나노입자를 제조하는 단계;
- (b) 상기 자성 나노입자에 신경 세포의 세포막단백질에 특이적인 항체를 결합시켜 항체-결합 자성 나노입자를 제조하는 단계;
- (c) 상기 항체-결합 자성 나노입자를 신경 세포에 접촉시키는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (c)의 결과물에 자기장을 인가하여 상기 신경 세포의 수상돌기의 성장 방향을 조절하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 자성 나노입자는 열 분해법(thermal decomposition), 공침전법(co-precipitation), 미세에멀전법(microemulsion), 미셀 합성법(micelle synthesis), 레이저 열분해법(laser pyrolysis) 또는 열수합성법(hydrothermal synthesis)에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 세포막단백질에 특이적인 항체는 신경 세포의 막 수용체(membrane receptors), 전송 단백질(transport proteins), 막 효소(membrane enzymes) 또는 세포 부착 분자(cell adhesion molecules)에 특이적인 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 신경 세포는 하이드로겔 상에서배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 자기장은 10 내지 20 mT의 가속 밀도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 자기장은 신경 세포의 수상돌기의 성장 방향을 연직 방향으로 조절하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

상기 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 신경 세포 배양물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경 세포 수상돌기의 성장 방향 조절 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생물체를 구성하는 기본 요소인 세포는 각 장기 또는 조직의 특성에 따라 일정한 규칙을 가지며 배열되어 있다. 그 중에서도 여러 세포들이 일정한 방향성을 가지고 자라고 있으며 이 구조를 바탕으로 기능을 하는 대표적인 장기/조직으로 뇌를 포함하는 신경계와 근육을 들 수 있다. 특히 신경세포를 이용한 성장 방향 제어 연구는 척수손상환자의 치료 방법 개발 및 뇌 구조를 모사한 장기칩 개발과 직접적으로 연관되어 있어 관련 연구가 지속적으로 수행되어왔다.

[0003] 2차원적인 신경 세포 돌기 성장 방향 제어 방법으로 기질의 표면에 나노실리카 입자를 패터화한 뒤 위에 그래핀 층을 덮어 패턴을 따라 신경 세포 돌기의 성장을 제어하는 방법(A. Solanki, et al., Advanced material, 5477-5482, 2013) 및 세포 친화적 고분자인 폴리라이신(Poly-Lysine)을 기관 위에 패터화하여 신경돌기의 가지가 주로 폴리라이신 상에 생성되는 것을 유도하는 방법(W. R Kim, et al., Lab chip, 799-805, 2014) 등이 있었다. 이와 같이 2차원 상에서의 신경 세포 돌기 성장 방향 제어는 바닥에특정한 물질의 처리 또는 구조 형성을 통해 세포가 따라서 자라게 하는 방법을 통해 이루어져 실제 생체 내의 3차원 신경 네트워크 형성과 같은 연구의 수행에는 한계가 있었다.

[0004] 신경 세포의 3차원 네트워크 형성과 구조체를 형성하기 위해 세포의 3차원 배양이 가능한 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin) 및 매트릭셀(matrigel)과 같은 하이드로젤을 이용한 바 있으나, 신경돌기 가지가 무질서하게 자라 얹히는 문제가 있었다. 신경돌기를 통한 무작위적인 신경세포 간 연결은 신경종과 같은 질환으로 발달할 수 있어 3차원 구조 내에서도 적용 가능한 세포 성장방향 제어 기술의 개발이 요구되었다.

[0005] 이를 위해 기존 3차원에서의 신경 세포 돌기의 성장 방향제어는 성장인자의 고정을 통한 농도기울기의 형성을 통해 신경 세포의 양성주화성을 이용한 세포 성장 제어기술(X. Cao, et al., Neuroscience, 381-389, 2003) 및 하이드로젤의 기계적인 물성 변화(H. G. Sundararaghavan, et al., Biotechnology and bioengineering, 632-643, 2008)를 통해서 신경 세포 돌기의 성장 방향을 3차원적으로 유도하는 기술 등이 있었다. 하지만 이와 같은 방법들은 고정화된 구조체를 통해 제한된 방향으로 성장을 유도할 수는 있었지만 중간에 방향을 전환하거나 서로 다른 세포 간 개별적 성장방향 조절이 불가능 할 뿐 아니라 신경돌기구조체가 있는 방향으로만 형성할 수 있다는 점에서 구조체 없이 3차원 상에서 원하는 방향으로 성장을 제어하는 것에 한계가 있었다.

[0006] 본 발명에서는 하이드로젤 내에서 3차원적으로 세포를 성장시키고 신경돌기의 형성을 유도하기 위해 세포와 특이적으로 결합할 수 있는 자성 나노입자를 이용하여 자기장의 방향 조절을 통해 원하는 방향으로 신경돌기의 성장방향을 유도하는 방법을 처음으로 개발하였다. 이 기술을 통하여 하이드로젤 상에서 패터화된 지지체 또는 추가적인 구조체의 형성 없이 다양한 종류의 신경 세포 돌기성장을 원하는 방향으로 방향을 제어할 수 있어 다양한 장기 모사 연구에 활용할 수 있다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 신경 세포의 돌기의 성장을 조절하고자 노력하였다. 그 결과, 자성 나노입자 및 자기장을 이용하여 신경 세포의 돌기의 성장을 조절하여 세포 독성이 없고 상기 신경 세포의 돌기를 자기장을 가한 방향(연직 방향)으로 조절하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 신경 세포 돌기의 성장 방향 조절 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 신경 세포 배양물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 신경 세포 돌기의 성장 방향 조절 방법을 제공

한다:

- [0013] (a) 자성 나노입자를 제조하는 단계;
- [0014] (b) 상기 자성 나노입자에 세포막단백질에 특이적인 항체를 결합시켜 항체-결합 자성 나노입자를 제조하는 단계;
- [0015] (c) 상기 항체-결합 자성 나노입자를 신경 세포에 접촉시키는 단계; 및
- [0016] (d) 상기 단계 (c)의 결과물에 자기장을 인가하여 상기 신경 세포의 돌기의 성장 방향을 조절하는 단계.
- [0017] 본 발명자들은 신경 세포의 돌기의 성장을 조절하고자 노력하였다. 그 결과, 자성 나노입자 및 자기장을 이용하여 신경 세포의 돌기의 성장을 조절하여 세포 독성이 없고 상기 신경 세포의 돌기를 자기장을 가한 방향(연직 방향)으로 조절하는 것을 확인하였다.
- [0018] 본 발명의 신경 세포 돌기의 성장 방향 조절 방법을 단계별로 상세히 설명한다.
- [0019] 단계 (a): 자성 나노입자의 제조
- [0020] 먼저, 자성 나노입자를 제조한다.
- [0021] 상기 자성 나노입자는 Fe_3O_4 및 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 와 같은 산화철, 철 및 코발트와 같은 순금속, MgFe_2O_4 , MnFe_2O_4 및 CoFe_2O_4 와 같은 강자성체(ferromagnets), CoPt_3 및 FePt 와 같은 합금을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 물질로 자성 나노입자를 제조할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 금속 전구체, 계면활성제 및 용매를 혼합하여 자성 나노입자를 제조한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 전구체는 철 전구체이다.
- [0024] 상기 철 전구체는, 철(II) 아세틸아세토네이트($\text{Fe}(\text{acac})_2$), 질산철(II)($\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$), 질산철(III)($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), 황산철(II)(FeSO_4), 황산철(III)($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), 철(III) 아세틸아세토네이트($\text{Fe}(\text{acac})_3$), 철(II) 트리플루오로아세틸아세토네이트($\text{Fe}(\text{tfac})_2$), 철(III) 트리플루오로아세틸아세토네이트($\text{Fe}(\text{tfac})_3$), 철(II) 아세테이트($\text{Fe}(\text{ac})_2$), 철(III) 아세테이트($\text{Fe}(\text{ac})_3$), 염화철(II)(FeCl_2), 염화철(III)(FeCl_3), 브롬화철(II)(FeBr_2), 브롬화철(III)(FeBr_3), 요오드화철(II)(FeI_2), 요오드화철(III)(FeI_3), 과염소산철($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$), 철 설파메이트($\text{Fe}(\text{NH}_2\text{SO}_3)_2$), 스테아르산철(II)(($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}$) $_2\text{Fe}$), 스테아르산철(III)(($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}$) $_3\text{Fe}$), 올레산철(II)(($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}$) $_2\text{Fe}$), 올레산철(III)(($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHCH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}$) $_3\text{Fe}$), 라우르산철(II)(($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}$) $_2\text{Fe}$), 라우르산철(III)(($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}$) $_3\text{Fe}$), 펜타카르보닐철($\text{Fe}(\text{CO})_5$), 엔니카르보닐철(enneacarbonyldiiron = $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$), 디소듐테트라카르보닐철($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CO})_4]$), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 철 전구체이다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 철 전구체는 철(II) 아세틸아세토네이트이다.
- [0026] 상기 계면활성제는 올레익산(oleic acid), 세틸트리메틸 암모늄 브롬화물(cetyl trimethyl ammonium bromide), 올레일 아민(oleyl amine), 트리옥틸 포스핀 산화물(trioctyl phosphine oxide), 트리부틸 포스핀 헥실 포스폰산(tributyl phosphine, hexyl phosphonic acid), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 라우르산(lauric acid), 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid), 폴리(1-비닐피롤리돈)-그래프트-(1-헥사디신)[poly(1-vinylpyrrolidone)-graft-(1-hexadecene)], 폴리(1-비닐피롤리돈)-그래프트-(1-비닐피롤리돈)-그래프트-(1-헥사디신)[poly(1-vinylpyrrolidone)-graft-(1-vinylpyrrolidone)-graft-(1-hexadecene)], 폴리(1-비닐피롤리돈)-그래프트-(1-트리아콘틴)[poly(1-vinylpyrrolidone)-graft-(1-triacontene)], 펜틸 베타-하이드록시 카르복실산(pentyl beta-hydroxy carboxylic acid), 헥실 베타-하이드록시 카르복실산(hexyl beta-hydroxy carboxylic acid), 사이클로헥실 베타-하이드록시 카르복실산(cyclohexyl beta-hydroxy carboxylic acid), 헵틸 베타-하이드록시 카르복실산(heptyl beta-hydroxy carboxylic acid), 옥틸 베타-하이드록시 카르복실산(octyl beta-hydroxy carboxylic acid), 노닐 베타-하이드록시 카르복실산(nonyl beta-hydroxy carboxylic acid), 데실 베타-하이드록시 카르복실산(decyl beta-hydroxy carboxylic acid), 언데실 베타-하이드록시 카르복실산(undecyl beta-hydroxy carboxylic acid), 1-부탄올(1-butanol) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 계면활성제이다.

- [0027] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 계면활성제는 올레익산이다.
- [0028] 상기 용매는 트리옥틸아민(trioctylamine), 헥사데칸(hexadecane), 헥사데센(hexadecene), 옥타데칸(octadecane), 옥타데센(octadecene), 아이코산(eicosane), 아이코센(eicosene), 페난트렌(phenanthrene), 펜타센(pentacene), 안트라센(anthracene), 바이페닐(biphenyl), 페닐 에테르(phenyl ether), 옥틸 에테르(octyl ether), 데실 에테르(decyl ether), 벤질 에테르(benzyl ether), 스쿠알렌(squalene) 및 이의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매이다.
- [0029] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 용매는 트리옥틸아민이다.
- [0030] 상기 자성 나노입자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 자성 나노입자는 열 분해법(thermal decomposition), 공침전법(co-precipitation), 미세이밀전법(microemulsion), 미셀 합성법(micelle synthesis), 레이저 열분해법(laser pyrolysis) 또는 열수합성법(hydrothermal synthesis)에 의해 제조된다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 자성 나노입자는 열 분해법에 의해 제조된다.
- [0033] 상기 열 분해법은 개시 물질인 금속 전구체, 계면활성제 및 용매의 비율을 조절하여 자성 나노입자의 크기 및 형태를 조절 할 수 있다. 또한, 반응 온도, 반응 시간 및 숙성기간(aging period)를 조절하여 자성 나노입자의 크기 및 형태를 조절 할 수 있다.
- [0034] 상기 금속 전구체, 계면활성제 및 용매를 혼합하여 교반기에서 100-400℃로 가열하여 자성 나노입자를 제조한다.
- [0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 100-150℃에서 0.5-3시간, 150-250℃에서 1-4시간, 250-350℃에서 0.5-3시간동안 반응시킨다.
- [0036] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 110-140℃에서 0.7-2시간, 170-230℃에서 1.5-3시간, 270-330℃에서 0.7-2시간동안 반응시킨다.
- [0037] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 125-135℃에서 0.8-1.5시간, 180-220℃에서 1.7-2.5시간, 280-320℃에서 0.8-1.5시간동안 반응시킨다.
- [0038] 상기 단계 (a) 이후에 자성 나노입자에 작용기를 도입하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 작용기는 아민기(NH₂), 카르복실기(COOH), 메르캅토기(SH), 아마이드기(CONH₂), 포스포네이트기(PO₃H), 설펜기(SO₃H), 황산기(SO₄H) 및 수산화기(OH)로부터 선택되는 하나 이상의 작용기이다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 작용기는 아민기이다.
- [0041] 상기 아민기는 아미노실란에 의해 도입될 수 있으며, 상기 아미노실란은 아미노에틸아미노이소부틸메틸디메톡시실란(aminoethylaminoisobutylmethyldimethoxysilane; APTES), (에틸린디마인프로필)-트리메톡시실란[(ethylenediaminepropyl)-trimethoxysilane] 및 감마아미노프로필트리메톡시실란(gammaaminopropyltriethoxysilane)으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노실란에 의해 도입된다.
- [0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아미노실란은 아미노에틸아미노이소부틸메틸디메톡시실란이다.
- [0043] 단계 (b): 항체-결합 자성 나노입자의 제조
- [0044] 다음, 상기 자성 나노입자에 세포막단백질에 특이적인 항체를 결합시켜 항체-결합 자성 나노입자를 제조한다.
- [0045] 상기 자성 나노입자가 신경 세포의 표면에 결합할 수 있도록, 상기 자성 나노입자에 세포막 단백질에 특이적인 항체를 결합시킨다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포막단백질에 특이적인 항체는 막 수용체(membrane receptors), 전송 단백질(transport proteins), 막 효소(membrane enzymes) 또는 세포 부착 분자(cell adhesion molecules)에 특이적인 항체이다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 “막 수용체”는 세포와 세포 밖 환경의 상호작용에 관여하는 막 단백질에 포함된 수용체를 의미한다. 세포 밖 신호 분자(예컨대, 호르몬, 신경전달물질, 사이토카인, 성장인자 또는 세포 인식 분자)가 세포 막 수용체에 결합하여 세포의 기능 변화를 유도한다. 상기 막 수용체는 이온 채널형 수용체[ion channel

linked receptors, 예컨대, 아세틸콜린 수용체(acetylcholine receptor)], 효소형 수용체[enzyme-linked receptors, 예컨대, EGF(Epidermal Growth Factor), PDGF(Platelet Derived Growth Factor), FGF(Fibroblast Growth Factor), HGF(Hepatocyte Growth Factor), 인슐린(insulin), NGF(Nerve Growth Factor)와 같은 성장인자에 대한 수용체], G 단백질-커플형 수용체(G protein-coupled receptors)를 포함한다. 본 명세서에서 용어 “전송 단백질”은 이온, 소분자 또는 대분자의 이동에 관여하는 막을 통과하는 단백질로, 채널/포어[channel/pore, 예컨대, 전압-개폐 이온 채널(voltage-gated ion channel), 아쿠아포린(aquaporin)], 전기화학적 전위-주도 운반체[electrochemical potential-driven transporters, 예컨대, 글루코즈 운반체(glucose transporter), 도파민 운반체(dopamine transporter)], 일차적 능동 운반[primary active transporters, 예컨대, ATP-결합 카세트 운반체(ATP-binding cassette transporter), 프로톤 펌프(proton pump)] 및 전자전달체(electron carriers)를 포함한다. 본 명세서에서 용어 “막 효소”는 세포 막에 포함된 효소로, 산화환원효소(oxidoreductase), 전이효소(transferase) 및 가수분해효소(hydrolase)를 포함한다. 본 명세서에서 용어 “세포 부착 분자”는 세포-세포 또는 세포-세포외기질의 결합에 관련된 세포 표면에 위치한 단백질을 의미한다. 상기 세포 부착 분자는 면역글로불린(immunoglobulin), 인테그린(integrins), 카데린(cadherins) 및 셀렉틴(selectins)를 포함한다.

- [0048] 단계 (c): 항체-결합 자성 나노입자의 신경 세포 접촉
- [0049] 다음, 상기 항체-결합 자성 나노입자를 신경 세포에 접촉시킨다.
- [0050] 상기 신경 세포는 신경계를 구성하는 세포로, 나트륨 통로, 칼륨 통로를 발현하며 전기적인 방법을 통해 신호를 전달 할 수 있다. 상기 신경 세포는 세포체(cell body), 수상돌기(dendrite), 축삭(axon) 및 시냅스(synapse)로 이루어져 있다.
- [0051] 본 발명의 신경 세포 돌기의 성장 방향 조절 방법은 3차원 배양의 신경 세포의 수상돌기의 성장 방향을 조절할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 세포는 하이드로겔 상에서 배양된다. 본 명세서에서 용어 “하이드로겔”은 수팽윤성 고분자 매트릭스(water-swelling polymeric matrix)로, 물을 흡수하여 다양한 탄성의 겔을 형성시킨다. 상기 매트릭스는 공유 및/또는 비공유 결합으로 결합된 거대분자의 3D 네트워크를 의미한다.
- [0053] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 하이드로겔 상에 배양된 신경 세포에 항체-결합 자성 나노입자를 처리한다. 상기 항체-결합 자성 나노입자는 신경 세포 막 단백질에 특이적으로 결합하게 된다.
- [0054] 단계 (d): 자기장의 인가
- [0055] 마지막으로, 상기 단계 (c)의 결과물에 자기장을 인가하여 상기 신경 세포의 수상돌기의 성장 방향을 조절한다.
- [0056] 상기 자기장의 방향 및 자속 밀도(magnetic flux density)에 따라 상기 신경 세포의 수상돌기의 성장 방향이 결정된다.
- [0057] 본 명세서에서, 용어 “자속 밀도”는 단위면적을 통과하는 자속(磁束)의 양으로, 자성체의 종류에 따른 자계 세기의 차이(자성체 내부에서의 자화 발생량)에도 불구하고 자성물질의 특성을 일률적으로 취급할 수 있게하는 물리량이다. MKS 단위계로 테슬라(tesla, T)를 쓴다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 자속 밀도는 10 내지 20 mT이다.
- [0059] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 자속 밀도는 13 내지 18 mT이다.
- [0060] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 자속 밀도는 14 내지 17 mT이다.
- [0061] 상기 신경 세포의 수상돌기의 성장 방향을 조절하기 위해선 적절한 자속 밀도가 중요하다. 상기 자속 밀도가 너무 높을 경우 세포가 한꺼번에 움직이게 되는 경우가 발생하며, 너무 낮을 경우에는 수상돌기의 성장에 영향을 미치기 어렵다.
- [0062] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 자기장은 신경 세포의 수상돌기의 성장 방향을 연직 방향으로 조절한다.
- [0063] 본 명세서에서, 용어 “연직 방향”은 지구의 중심을 향하는 중력의 방향 또는 어떤 직선이나 평면에 대하여 수직인 방향을 의미한다.
- [0064] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 신경 세포 배양물을 제공한다.

[0065] 본 발명의 신경 세포 배양물은 상기 신경 세포 수상 돌기의 성장 조절 방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0066] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0067] (a) 본 발명은 신경 세포 수상돌기의 성장 방향 조절 방법 및 상기 방법에 의해 조된 신경 세포 배양물을 제공한다.

[0068] (b) 본 발명은 자성 나노입자 및 자기장을 이용하여 용이한 방법으로 신경 세포의 수상돌기 성장 방향을 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 에탄올 용액 상에서 분리되기 전(A)과 후(B)의 자성 나노입자 및 그의 투사 전자 현미경 이미지(C)를 나타낸다.

도 2는 자성 나노입자가 처리된 SHSY-5Y의 시간에 따른 활성도를 나타낸다.

도 3a 및 3b는 자기장의 유무에 따른 신경 세포 돌기 성장을 비교한 결과로, 도 3a는 자성 나노입자는 처리하였으나 자기장을 가해주지 않은 세포의 이미지이고, 도 3b는 자성 나노입자를 처리한 후 연직방향으로 자기장을 형성하여 아래방향으로 성장을 유도한 세포의 이미지를 나타낸다.

도 4a 및 4b는 각도와 길이에 따른 신경돌기의 분포를 나타낸 표로 도 4a는 자기장을 가해주지 않은 세포의 신경돌기의 분포이고, 도 4b는 연직방향으로 자기장을 형성하여 아래방향으로 성장을 유도한 세포의 신경돌기의 분포를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 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 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0071] 실시예1: 자성 나노입자의 제조

[0072] 자성 나노입자의 기본 구성 물질인 철아세틸아세토네이트(iron acetylacetonate)를 계면활성제인 올레익산(Oleic acid), 올레일아민(Oleylamine) 등과 1:11의 몰 농도 비율로 트리옥틸아민(Tri-octylamine) 용액에 첨가하여 혼합하였다. 위 혼합물을 교반기에 넣고 130℃에서 1시간, 200℃에서 2시간, 300℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 실온(25℃)과 유사한 온도가 될 때까지 냉각하였다.

[0073] 합성된 자성 나노입자를 10,000 rpm 조건에서 5분 동안 원심 분리를 실시하고 침전물을 수거하여 에탄올에 분산시킨 다음, 초음파 분쇄기를 사용하여 분산시켰다. 3번 이상의 재분산 및 세척 과정을 반복하여 에탄올 상에 분산된 자성 나노입자를 수득하였다.

[0074] 상기 자성 나노입자를 산소 플라즈마 기법을 이용하여 산화시켜 표면에 수산화기(OH)가 형성된 산화 자성 나노입자를 얻는다. 0.1 mg/ml의 농도로 희석된 산화 자성 나노입자 용액과 에탄올에 5% 농도로 희석된 3-아미노프로필트라이에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane; APTES) 용액을 9:1 비율로 혼합하여 2시간 동안 반응시켜 아민기(NH₂)가 노출된 자성 나노입자를 제조하였다. 그리고 세포막단백질인 노르아드레날린(noradrenaline)에 특이적으로 작용하는 항-노르아드레날린 항체(Abcam, 미국), 10 μM EDC 및 NHS를 각각 125 μl씩 자성 나노입자 용액에 첨가하여 2시간 동안 반응시킴으로써 세포 표면에 부착될 수 있는 자성 나노입자를 합성하였다.

[0075] 도 1은 분리 및 정제과정을 거쳐 에탄올에 분산된 자성 나노입자(A)가 자석에 의하여 분리된 사진(B)과 그 입자의 투사전자현미경(TEM) 사진(C)이다.

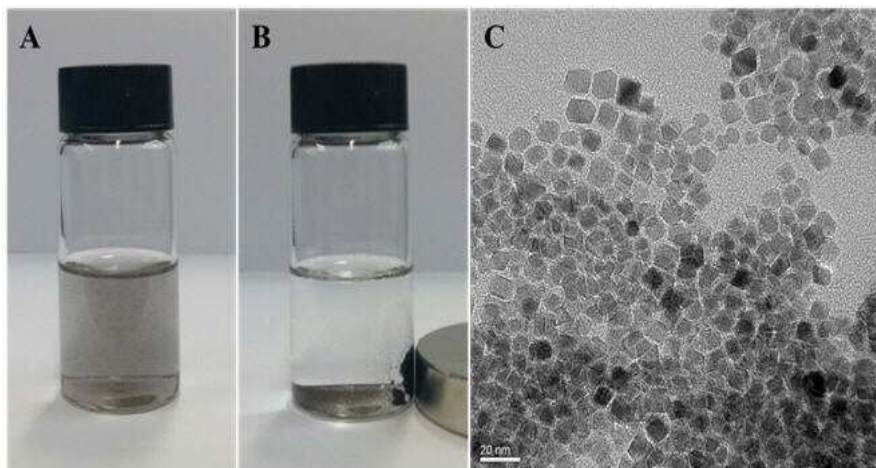
[0076] 도 2는 자성 나노입자의 크기를 나타낸다. 자성 나노입자의 평균 크기는 29.4 nm이다.

[0077] 실시예2: 세포배양 및 자성 나노입자의 처리

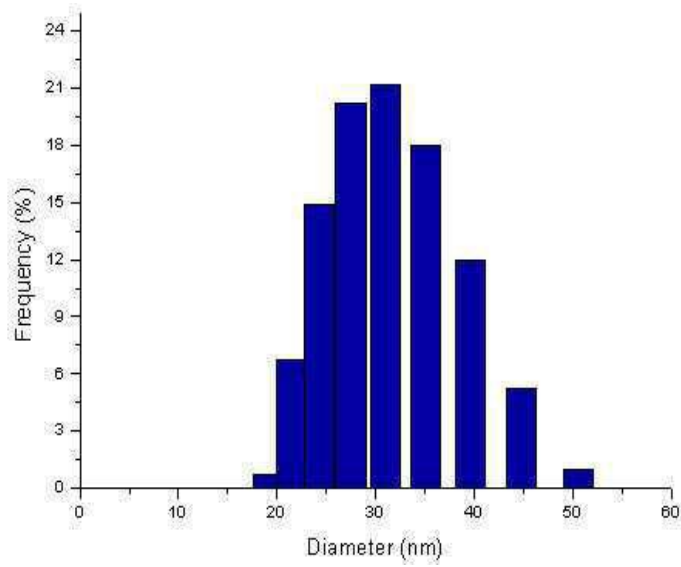
- [0078] 3차원의 세포 배양을 위해 하이드로젤을 이용하였다. 하이드로젤은 30 μ l 매트릭셀(Matrigel)과 30 μ l 콜라겐의 1:1 혼합물로 이루어져있다. 콜라겐은 26.4 μ l 콜라겐 Type I, 3 μ l DMEM(Dubelco' s Modified Eagle Medium) 배지 및 0.6 μ l 1M NaOH를 혼합하여 제조하였다.
- [0079] 본 연구에 사용된 세포는 신경모세포종인 SHSY-5Y 세포이며 DMEM배지에 10% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum: FBS) 및 1% 페니실린 스트렙토마이신 (penicillin streptomycin)을 첨가한 배지로 배양하였다.
- [0080] 커버글라스로 만들어진 기관 위에 하이드로젤 60 μ l를 첨가하고 세포 배양기 안에서 30분 동안 겔화시켰다. 형성된 하이드로젤층에 SHSY-5Y 세포 1×10^4 을 고정시킨 후 안정화를 위해 2시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 이후 상기 실시예 1에서 수득한 자성 나노입자를 세포에 처리하여 SHSY-5Y 세포에 자성 나노입자를 부착하였다. 자성 나노입자는 DMEM에 용해되어 0.1 mg/ml의 농도로 세포에 처리되었다. 도 3는 자성 나노입자의 처리에 따른 독성 유무를 확인 한 결과로 72시간 동안 독성이 나타나지 않았음을 보여주고 있다.
- [0081] **실시예 3: 자기력 기반 신경 세포 돌기 성장 방향 조절**
- [0082] 실시예 2에서 진행한 바와 같이 자성 나노입자가 하이드로젤 내의 SHSY-5Y 세포에 고정되면 자석을 이용하여 자기장을 형성한 후 성장을 유도하였다. 자기장의 방향 및 자속 밀도에 따라 신경 세포 돌기의 성장 방향이 결정되며 여기서의 자속 밀도는 15.4 mT이다. 자속 밀도가 너무 높을 때는 세포가 한꺼번에 움직이는 경우가 발생하기 때문에 적절한 자속 밀도의 결정은 신경 세포 돌기 성장 유도 기술의 중요한 요인 중 하나이다. 자기장의 유무에 따른 신경돌기의 성장을 보기 위해 자성 나노입자의 처리 후 일주일 동안 자기장을 가해주었으며 그 결과는 도 4a 및 4b와 같다. 자기장 없이 배양한 신경세포(도 4a)의 경우 수직 방향으로 20 μ m의 폭을 가지면서 자란 것과 달리 자기장을 가해준 신경세포(도 4b)는 100 μ m까지 수직 방향으로 자란 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 자기장의 유무에 따른 신경돌기의 성장 방향을 분석한 결과에 따르면 자기장을 가해준 조건에서 형성된 신경돌기 역시 각도상으로 더 연직방향에 가까움을 알 수 있다(도 5).
- [0083] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

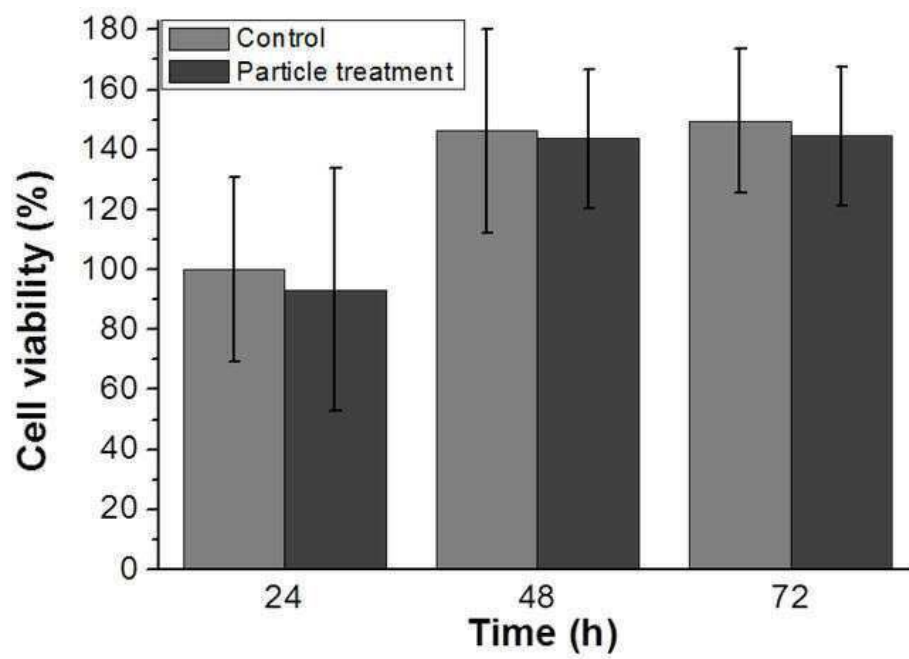
도면1



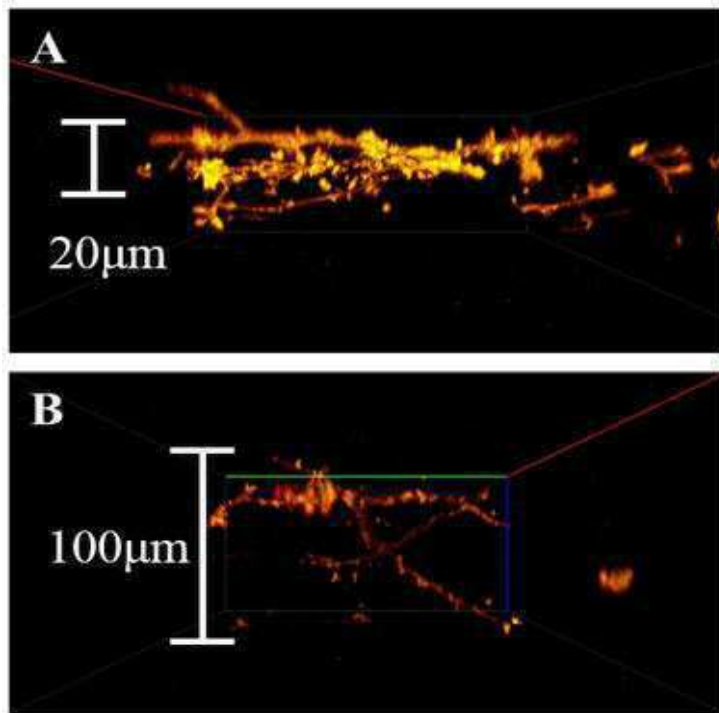
도면2



도면3



도면4



도면5

