



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0135669

(43) 공개일자 2015년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 3/00 (2006.01) *B81B 7/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0062155

(22) 출원일자 2014년05월23일

심사청구일자 2014년05월23일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

정봉근

경기 과천시 관문로 143,1110동 205호(중앙동, 래미안에코팰리스아파트)

이종민

서울 마포구 백범로 35, 페이아르관 606호 (신수동, 서강대학교)

이유리

경기 수원시 권선구 정조로565번길 27, 2동 402호 (세류동, 신형하이츠빌라)

(74) 대리인

양부현

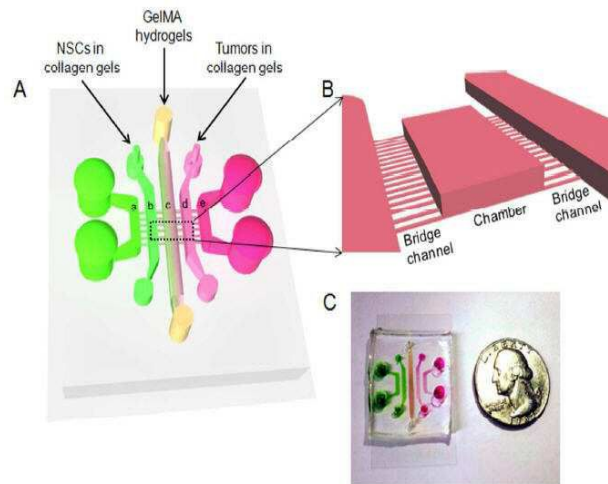
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 세포 공동-배양을 위한 하이드로젤 기반 미세유체칩

(57) 요약

본 발명은 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체(microfluidic) 장치에 관한 것으로, 상기 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치는 (a) 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤로 구성된 배리어(barrier); 및 (b) 콜라겐 하이드로젤로 구성된 스캐폴드(scaffold)로 구성된다. 본 발명에 따르면, 상기 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치는 세포의 분화환경 조절과 공동 배양을 위한 중요한 도구로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3A9D7030461

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 Dark Matter 진단을 위한 일체형 미세유체 진단 플랫폼 기술개발

기 여 율 30/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H-GUARD_2014M3A6B2060503

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 바이오나노헬스가드연구단

연구사업명 글로벌프론티어사업

연구과제명 디지털 진단을 위한 마이크로플루이딕칩 개발

기 여 율 40/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3347

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발사업

연구과제명 기능성 마이크로기술을 이용한 세포의 균질화 및 약물 스크리닝 시스템 개발

기 여 율 30/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2015.12.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤로 구성된 배리어(barrier); 및 (b) 콜라겐 하이드로젤로 구성된 스캐폴드(scaffold);로 구성된 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체(microfluidic) 장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 아크릴 고분자는 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴산 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴산 공중합체, 시아노에틸 메타크릴산 공중합체, 아미노알킬 메타크릴산 공중합체, 폴리(아크릴산) 공중합체, 폴리아크릴아마이드 공중합체, 글리시딜 메타크릴산 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 아크릴 고분자인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 1-50 중량%의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 광가교결합(photo-crosslinking)하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 II, 콜라겐 타입 III, 콜라겐 타입 IV, 콜라겐 타입 V 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 콜라겐인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 콜라겐 하이드로젤은 세포가 캡슐화(encapsulation)되는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치의 제조방법:

- (a) 제1 내지 제5의 5개의 챔버로 구성된 챔버(chamber) 및 상기 챔버를 연결하는 브릿지 채널(bridge channel)을 포함하는 미세유체 장치를 제조하는 단계;
- (b) 상기 제3챔버에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤을 주입하는 단계;
- (c) 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤을 광가교결합(photo-crosslinking)하는 단계;
- (d) 콜라겐 하이드로젤로 2종류의 세포를 각각 캡슐화(encapsulation)하는 단계;

- (e) 단계 (d)의 결과물을 제2 및 제4챔버에 각각 주입하는 단계;
- (f) 배양 배지를 제1 및 제5챔버에 각각 주입하는 단계; 및
- (g) 세포를 공동-배양하는 단계.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 아크릴 고분자는 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴산 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴산 공중합체, 시아노에틸 메타크릴산 공중합체, 아미노알킬 메타크릴산 공중합체, 폴리(아크릴산) 공중합체, 폴리아크릴아마이드 공중합체, 글리시딜 메타크릴산 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 아크릴 고분자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 1-50 중량%의 농도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 II, 콜라겐 타입 III, 콜라겐 타입 IV, 콜라겐 타입 V 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 콜라겐인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 세포 공동-배양을 위한 하이드로젤 기반 미세유체칩에 관한 것이다.

배경 기술

신경 줄기 세포(Neural stem cells; NSCs)는 신경원성 대사질환 및 척수외상을 연구하는데 매우 중요한 세포원이다.¹ NSC는 신경세포(neurons), 성상세포(astrocytes) 및 희돌기교세포(oligodendrocytes)의 3종류 주요한 세포 계통으로 분화하는 것으로 알려져 있다.² 일반적으로, NCS는 신경세포로 분화된 후에 성상세포 및 희돌기교세포로 분화한다.³ NSC-유래 신경 분화는 세포의 기질(extracellular matrix; ECM)-기반 하이드로젤(hydrogel)을 이용하여 연구되었다. 예컨대, 배아의 피질 신경상피로부터 분리한 NSC를 콜라겐 타입 I 젤에 현탁하여 3차원의 신경 서킷을 제조하였다. 콜라겐 내에 캡슐화된 NSC는 신경 세포로 성장하게 된다. 반면, GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein)-양성 성상세포 및 O4-양성 희돌기교세포는 10일까지 관찰되지 않았다. 전기생리학적 분석을 통해 3D 콜라겐에서 배양된 NSC는 Tuj1-양성 신경세포로 분화할 때 전압-개폐(voltage-gated) K^+ 및 Na^+ 이온 전류가 변화함을 확인하였다. 그러나, 미분화된 NSC에서는 전압-개폐 Na^+ 이온 전류가 크지 않았다. 또한, 콜라겐 젤 내 캡슐화된 NSC-유래 신경세포가 시냅스 소포 순환(synaptic vesicle recycling)을 나타냄을 확인하였다. 더욱이, 3D 콜라겐 타입 I 젤-히알루로난 기질은 NSC-유래 신경 분화를 유도하였다.⁵ 배아 뇌 유래 전구세포는 성숙세포와 비교하여 빠르게 성장하였다. 3D 콜라겐 타입 I 젤-히알루로난 기질에서 6일 동안 배양한 NSC는 주로 신경세포(-70%)로 분화하였다. 반면, 6일째에 피브로넥틴-코팅 글래스 상에 14% NSC-유래 신경세포만 관찰되었다. 이는 글루타메이트, γ -아미노부티르산 및 시냅신 I의 발현을 통해 다수의 β III-튜불린-양성 세포가 성숙 신경 분화를 나타냄을 의미한다.

하이드로젤은 이식용 재료 및 재생 조직에의 적용에 많은 관심을 받고 있다. 물을 함유하는 하이드로젤은 3D 상에서 복잡한 중합 결함을 갖는다.^{6,7} 특히, 천연 하이드로젤(예컨대, 젤라틴, 콜라겐 및 히알루론산염)은 인

간 조직의 특성과 유사한 생분해성 하이드로젤의 화학적 및 기계적 특성으로 인해 조직 지지체를 대체하는 대체 재료로 널리 이용되어왔다.⁸⁻¹⁰ 하이드로젤-기반 3D 배양법은 줄기세포-기반 조직 공학에 널리 이용되어 왔다.^{11,12} 특히, 최근에 줄기세포의 분화를 조절하기 위해 광가교결합이 가능한(photo-crosslinkable) 하이드로젤이 사용되었다. 예컨대, 공간적으로 세포를 캡슐화하고 패터닝하기 위해 구리-유리(cooper-free) 클릭 화학-기반 세포호환성 하이드로젤이 사용되었다.¹³ 이는 bis(cyclooctyne)-functionalized peptide crosslinker를 사용한 poly(ethylene glycol) tetra-azide 및 self-quenched collagenasesensitive 검출 펩타이드에 의해 제조된 세포-캡슐화 하이드로젤을 보여주었다. Arg-Gly-Asp(RGD) 펩타이드를 포함하는 하이드로젤 내 공간적으로 형성된 섬유아세포가 관찰되었다. 이러한 방법은 생물학적으로 기능적인 하이드로젤의 감광성 제조에 유용할 수 있다. 다공성 광가교결합 메타크릴아마이드 키토산(methacrylamide chitosan)은 NSC 분화를 유도하는데 이용되어왔다.¹⁴ 다공성을 조절하기 위해, D-만니톨 결정체를 메타크릴아마이드 키토산과 혼합하였다. D-만니톨 결정체는 구멍의 평균 크기를 증가시켜 산소 확산율을 증가시켰다. 다공성 메타크릴아마이드 키토산에서 배양한 NSC의 성장은 다공성과 반비례하였다. 반면에, 다공성 메타크릴아마이드 키토산 지지체는 NSC의 분화를 유도하였다. 신경전구세포의 분화를 조절하기 위해 메타크릴산염-조각 히알루론산-기반 하이드로젤이 사용되었다.¹⁵ 압축계수에 대한 메타크릴산염-조각 히알루론산-기반 하이드로젤 농도의 영향을 조사한 결과, 압축계수는 하이드로젤 농도와 함께 증가하였다. 신경전구세포는 신경의 분화로 히알루론산 하이드로젤 내 광-캡슐화되었다. 흥미롭게도, 딱딱한 하이드로젤 내 배양된 신경전구세포는 대부분 GFAP-양성 성상세포로 분화하였다. 신경전구세포의 분화는 뇌 조직과 유사한 하이드로젤의 기계적 특징에 의해 유의하게 영향을 받는 것을 확인하였다. 광가교결합 RGD 알지네이트 젤은 지방전구세포에 직접적으로 사용되어왔다.¹⁶ 하이드로젤의 기계적 특성은 부착 펩타이드 밀도 및 Ca^{2+} 농도에 의해 조절되었다. 딱딱한 하이드로젤 내 세포는 무른 하이드로젤에서 보다 더 증식하였고, 딱딱한 하이드로젤 내 배양된 전-지방세포는 대부분 VEGF(Vascular Endothelial Growth Factors)를 분비하였다. 이는 지방세포-유래 분화는 하이드로젤 기질의 기계적 강도에 제한적임을 의미한다.

[0004]

줄기세포의 분화는 다양한 세포의 미세환경에 의해 많은 영향을 받는다.¹⁷ 줄기세포의 운명을 제어하기 위해, 최근 다양한 다기능적인 미세유체 장치가 개발되었다.¹⁸⁻²² 예컨대, 마우스 배아줄기세포로부터 신경 분화를 유도하기 위해 구획이 있는 미세유체 배양 장치가 개발되었다.²³ 미세유체 배양 장치 내로 로딩된 배아체(embryonic body)는 신경세포로 분화하였고 브리지(bridge) 미세통로를 통해 축삭돌기를 확장하여, 축삭돌기의 배열을 형성하였다. 지지체로서 3D 젤 기질의 사용은 인비보(*in vivo*) 조직 환경을 모방할 수 있기 때문에 2D 배양을 능가하는 유의한 장점을 갖는다. 이전 연구에서 NSC는 ECM-기반 3D 미세유체 장치에서 배양되었다.²⁰ NSC 및 ECM 하이드로젤(예컨대, 콜라겐 타입 I, 매트릭젤 및 콜라겐 타입 I 및 매트릭젤의 혼합)은 미세통로의 중앙에 로딩되었고, 다양한 성장인자를 포함하는 성장 배지는 사이드통로에 위치하였다. 미세유체 장치 내 NSC 분화에 있어서 3 종류의 ECM 하이드로젤의 영향을 조사하였다. 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction; qRT-PCR) 분석은 콜라겐 젤에서 배양된 세포와 비교하여 3D 매트릭젤-기반 하이드로젤에서 배양된 NSC가 신경세포 및 희돌기교세포로 잘 분화됨을 보여주었다. 이는 라미닌(laminin)이 매트릭젤의 주요 구성이기 때문이다. 반면에, qRT-PCR 분석은 매트릭젤 또는 3D ECM 하이드로젤에서 배양된 NSC는 대부분 희돌기교세포로 분화하지 않음을 나타내었다. 더욱이, 3D 미세유체 장치는 마우스 배아 줄기세포, 유방암 세포 및 간세포의 공동-배양에 적용되었다.²⁴ 반다공막이 함입된 2중층 구획화된 미세유체 장치는 3D 타원체의 야누스(Janus) 패턴의 공동배양에 사용되었다. 여러 다른 종류들로 이루어진 타원체는 미세유체의 유체역학 장치로, 미세통로의 기하학적 구조로 역학적 세포 미세패터닝의 모양을 조절하였다. 마우스 배아 줄기세포는 세포 타원체의 안쪽에 위치하고, 유방암 세포(MDA-MB-231) 또는 간암세포(HepG2)는 타원체의 바깥쪽에 위치하는 것은 야누스 3D 세포 타원체가 마우스 배아 줄기세포의 공간적 분화를 조절할 수 있음을 나타낸다. 비록 이전의 3D 미세유체 장치는 세포-기반 신경 분화 또는 공동-배양 시스템에 이용되어 왔지만, 분자적 확산에 대한 광-가교결합 하이드로젤의 영향 및 3D 미세유체 공동-배양 장치의 가교-오염에 대하여 고려하지 않았다.

[0005]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허

문헌의 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

- [0006] 본 발명자들은 세포의 분화환경을 조절할 수 있는 3D 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체(microfluidic) 장치를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 젤라틴 하이드로겔로 구성된 배리어(barrier)의 젤라틴 하이드로겔 농도에 따른 배양 배지의 분자 확산(molecule diffusion)을 조절하고, 콜라겐 하이드로겔에 캡슐화된 신경줄기세포 및 암세포를 공동-배양하여 신경줄기세포의 신경세포로의 분화를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 하이드로겔-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 하이드로겔-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 젤라틴 하이드로겔로 구성된 배리어(barrier); 및 (b) 콜라겐 하이드로겔로 구성된 세포 지지체(scaffold);로 구성된 하이드로겔-기반 3D 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체(microfluidic) 장치를 제공한다.
- [0011] 본 발명자들은 세포의 분화환경을 조절할 수 있는 3D 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체(microfluidic) 장치를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 젤라틴 하이드로겔로 구성된 배리어의 젤라틴 하이드로겔 농도에 따른 배양 배지의 분자 확산(molecule diffusion)을 조절하고, 콜라겐 하이드로겔에 캡슐화된 신경줄기세포 및 암세포를 공동-배양하여 신경줄기세포의 신경세포로의 분화를 확인하였다.
- [0012] 본 발명의 주요한 특징은 세포 공동-배양을 위한 미세유체 장치에 하이드로겔로 구성된 배리어를 두어 공동-배양하는 세포 사이의 분자 확산을 조절하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 하이드로겔-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치는 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로겔로 구성된 배리어를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 아크릴 고분자는 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴산 공중합체, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 에톡시에틸 메타크릴산 공중합체, 시아노에틸 메타크릴산 공중합체, 아미노알킬 메타크릴산 공중합체, 폴리(아크릴산) 공중합체, 폴리아크릴아마이드 공중합체, 글리시딜 메타크릴산 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 아크릴 고분자이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 아크릴 고분자는 메타크릴산 공중합체, 메틸 메타크릴산 공중합체, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 아크릴 고분자이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 아크릴 고분자는 메타크릴산 공중합체이다.
- [0015] 본 발명의 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로겔은 농도를 조절하여 세포 공동-배양의 분자 확산을 조절할 수 있다. 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로겔은 당업계의 공지된 다양한 방법에 따라 제조할 수 있다. 예컨대, PBS(Phosphate Buffered Saline)에 젤라틴을 완전히 용해될 때까지 50℃로 교반하여 혼합하고, 무수 메타크릴산(methacrylic anhydride)를 0.5 ml/분의 속도로 첨가하여 GelMA(Gelatin methacrylate) 하이드로겔을 제조한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로겔은 1-50 중량%의 농도를 갖

는다.

- [0017] 본 발명의 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤의 농도를 조절하여 세포 공동-배양의 분자 확산을 조절할 수 있다. 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤의 농도가 1-20 중량%인 경우, 분자 확산이 진행되어 공동-배양되는 세포는 상호작용하게 된다. 또한, 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤의 농도가 21-50 중량%인 경우, 분자 확산이 억제되어 공동-배양되는 세포의 상호작용이 차단된다.
- [0018] 본 발명의 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치의 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 광가교결합(photo-crosslinking) 한다.
- [0019] 본 명세서에서, 용어 “광가교결합”은 광개시제(photoinitiator)의 존재하에 빛을 조사하여 공유적 및 물리적으로 가교결합을 형성시켜 중합시키는 과정을 의미한다. 상기 광개시제는 화합물질로 빛에 의해 중합 반응 및/또는 라디칼 가교결합을 개시한다.
- [0020] 본 발명의 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤의 광가교결합은 GeIMA 하이드로젤을 PBS 및 광개시제(photo-initiator)인 80℃의 2-히드록시-1-(4-(히드록시에톡시)페닐)-2-메틸-1-프로판논(2-hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone)과 혼합하고, 챔버에 주입한 후, 자외선(360-480 nm 파장)을 조사하여 광-가교결합을 유도한다.
- [0021] 본 발명의 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치는 콜라겐 하이드로젤을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 II, 콜라겐 타입 III, 콜라겐 타입 IV, 콜라겐 타입 V 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 콜라겐이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 II, 콜라겐 타입 III 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 콜라겐이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 콜라겐은 콜라겐 타입 I이다.
- [0023] 본 발명의 상기 콜라겐 하이드로젤은 세포 공동-배양을 위한 스캐폴드로 이용된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “스캐폴드”는 “인공지지체” 또는 “세포 담체”와 동일한 의미이다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 콜라겐 하이드로젤은 세포가 캡슐화(encapsulation) 된다.
- [0025] 본 명세서에서 용어, “캡슐화”는 세포 캡슐화로, 세포 대사의 필수적인 산소, 영양, 성장인자 등의 유입, 및 노폐물 및 치료 단백질의 유출과 같은 분자의 양방향성 확산이 가능하게 중합된 반-투과성 젤(또는 막) 내 세포가 고정화되는 것을 의미한다. 세포 캡슐화 기술의 주요 동기는 조직 공학 적용에 있어 이식편거부반응(graft rejection)에 존재하는 문제를 극복하여 장기 이식 후 부작용을 조적하기 위한 면역억제 약물의 장기(long-term) 사용을 감소시키기 위함이다.
- [0026] 상기 세포가 캡슐화된 콜라겐 하이드로젤은 세포의 3D 배양을 가능하게 한다.
- [0027] 본 명세서 용어 “3D 세포 배양”은 3차원적으로 생물학적 세포가 성장하고 주변 환경과 상호작용 할 수 있도록 인공적으로 조성된 환경에서 배양하는 것을 의미한다.
- [0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치의 제조방법을 제공한다:
- [0029] (a) 제1 내지 제5의 5개의 챔버로 구성된 챔버(chamber) 및 상기 챔버를 연결하는 브릿지 채널(bridge channel)을 포함하는 미세유체 장치를 제조하는 단계;
- [0030] (b) 상기 제3챔버에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤을 주입하는 단계;
- [0031] (c) 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤을 광가교결합(photo-crosslinking)하는 단계;
- [0032] (d) 콜라겐 하이드로젤로 2종류의 세포를 각각 캡슐화(encapsulation)하는 단계;
- [0033] (e) 단계 (d)의 결과물을 제2 및 제4챔버에 각각 주입하는 단계; 및
- [0034] (f) 세포를 공동-배양하는 단계.
- [0035] 본 발명의 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치를 제조하기 위해, 먼저, 제1 내지 제5의 5개의 챔

버로 구성된 챔버(chamber) 및 상기 챔버를 연결하는 브릿지 채널(bridge channel)를 포함하는 미세유체 장치를 제조한다.

[0036] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 미세유체 장치는 공지된 방법을 이용하여 2 단계 포토리소그래피(photolithography) 방법으로 챔버 및 브리지 채널을 제조한다. 간단하게, 3D 미세유체 공동-배양 장치를 제조하기 위해, AutoCAD 프로그램으로 챔버 및 브리지 채널을 디자인한다. 브리지 채널을 제조하기 위해, SU-8 25 포토레지스트(photoresist)를 실리콘 웨이퍼 상에 스핀-코팅(1000 rpm, 60 초 및 40 Gm in thickness)하고, 챔버를 제조하기 위해, SU-8 100을 SU-8 25 포토레지스트-패턴 기질 상에 스핀-코팅(1000 rpm, 60 초 및 250 Gm in thickness)한다. PDMS[poly(dimethylsiloxane)] 전구 용액(precursor solution)을 포토레지스트-패턴 실리콘 웨이퍼로 본뜨고, PDMS-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치를 글래스 슬라이드에 산소 플라스마 처리하여 접착하여 제조한다.

[0037] 다음, 상기 제조된 미세유체 장치의 제3챔버에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤을 주입한다.

[0038] 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 상기 미세유체 장치에서 배리어 역할을 하게 된다. 본 발명의 미세유체 장치를 구성하는 제1 내지 제5의 5개의 챔버는 도 1a의 a 내지 e 챔버를 참조한다. 중심에 위치하는 제3챔버 즉, c 챔버에 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤을 주입한다.

[0039] 상기 젤라틴 및 아크릴 고분자가 혼합된 하이드로젤은 광가교결합되어야 하므로 광개시제를 포함하며 챔버 주입 후, UV를 조사하여 광가교결합을 유도한다.

[0040] 다음, 세포 공동-배양을 위해, 2 종류의 세포를 각각 콜라겐 하이드로젤로 캡슐화하여 제2 및 제4챔버에 각각 주입한다. 상기 제2 및 제4챔버는 도 1a의 b 및 d 챔버에 해당한다.

[0041] 상기 캡슐화된 세포의 배양을 위해, 제1 및 제5챔버에 배양 배지를 주입한다. 상기 제1 및 제5챔버는 도 1a의 a 및 e 챔버는 도 1a의 a 및 e 챔버에 해당한다. 상기 배양 배지는 당업계에 공지된 어떠한 배양 배지를 주입할 수 있으며, 예컨대, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), F12, RPMI1640 및 이의 혼합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 하나 이상의 배양 배지를 기본 배양 배지로 하고, 당업계에 공지된 다양한 서플리먼트를 추가적으로 포함할 수 있다. 예컨대, B27 서플리먼트, L-글루타민, 젤타마이신, 헤파린, FBS(Fetal Bovine Serum) 및 페니실린-트랩토마이신 등이 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 마지막으로, 세포를 공동-배양한다.

[0043] 본 발명에 일 구현예에 따르면, 상기 세포는 신경줄기세포(neural stem cell), 배아 줄기세포(embryonic stem cell; ESC), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell; iPSC), 조혈모세포(haematopoietic stem cell; HSC), 조혈전구세포(haemopoietic precursor cell; HPC), 림프 선조 세포(lymphoid progenitor cell) 및 흉선 선조 세포(thymic progenitor cell)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 줄기세포; 및 유방암세포, 전립선암세포, 직장암세포, 폐암세포, 췌장암세포, 난소암세포, 방광암세포, 자궁내막암세포, 자궁경부암세포, 간암세포, 신장암세포, 갑상선암세포, 골암세포, 림프종암세포 및 피부암세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 암세포이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포는 신경줄기세포, 배아 줄기세포 및 유도만능 줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 줄기세포; 및 유방암세포, 전립선암세포, 직장암세포 및 폐암세포로 구성된 군으로부터 선택되는 암세포이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 세포는 신경줄기세포 및 유방암세포이다.

[0044] 본 발명의 방법은 상기 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양 미세유체 장치의 제조방법으로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0046] (a) 본 발명은 하이드로젤-기반 3D 세포 공동-배양(co-culture) 미세유체(microfluidic) 장치 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0047] (b) 본 발명은 세포의 분화환경 조절과 공동 배양을 위한 중요한 도구로 사용될 수 있다.

[0048] (c) 본 발명은 생체적합성이 우수하고, 기계적 물성이 좋으며 경제적이다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1a 내지 1c는 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치를 나타낸다. 도 1a는 5개의 챔버 및 4개의 브리지 채널로 구성된 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치의 도식을 나타낸다. 도 1b는 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치의 횡단면을 나타낸다. 도 1c는 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치의 사진을 나타낸다.

도 2a 내지 2c는 광가교결합 GelMA 하이드로젤의 5 w/v%, 15 w/v% 및 25 w/v%에 따른 SEM 이미지를 나타낸다. 스케일바는 20 μ m를 나타낸다.

도 3a 내지 3b는 GelMA 하이드로젤 농도(5-25 w/v%)의 영향을 나타낸다. 도 3a 및 3b는 각각 구멍 크기 및 종횡비를 나타낸다. 종횡비는 구멍의 길이를 구멍의 너비로 나눈 값을 의미한다(*p<0.05, **p<0.01).

도 4a 내지 4d는 광가교결합 GelMA 하이드로젤-로딩 3D 미세유체 공동-배양 장치의 분자 확산의 분석을 나타낸다. 도 4a는 GelMA 하이드로젤-로딩 c 챔버, 및 콜라겐 타입 I 젤-로딩 b 및 d 챔버의 형광 이미지를 나타낸다. 도 4b는 녹색 형광 다이-로딩 a-b 챔버, 25 w/v% GelMA 하이드로젤-로딩 c 챔버 및 빨강색 형광 다이-로딩 d-e 챔버의 형광 이미지를 나타낸다. 도 4c 및 4d는 각각 GelMA 하이드로젤-로딩 c 챔버의 분자확산에 대한 1일 및 6일의 결과를 나타낸다(*p<0.05, **p<0.01). FITC-텍스트란(20 kDa) 용액을 a 챔버에 로딩하였다. 형광 분자는 b 챔버에서 d 챔버로 확산되었다. 스케일바는 1 mm를 나타낸다.

도 5a 내지 5d는 NSC 및 암세포가 배양된 2D 표면 및 3D 콜라겐 젤을 나타낸다. 도 5a는 2D 표면에서 6일 동안 배양한 NSC-유래 신경세포의 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 도 5b는 2D 표면에서 6일 동안 배양한 암세포의 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 도 5c는 3D 콜라겐 젤에서 6일 동안 배양한 NSC의 신경 분화의 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 도 5d는 3D 콜라겐 젤에서 6일 동안 배양한 암세포의 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

도 6a 내지 6e는 하이드로젤-기반 3D 미세유체 장치의 NSC 및 암세포 공동배양을 나타낸다. 도 6a는 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치에서 6일 동안 배양된 NSC로부터 신경세포 분화의 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 도 6b는 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치에서 6일 동안 배양된 암세포의 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 도 6c는 도 6a의 흰점선박스의 고배율 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 도 6d는 도 6b의 흰점선박스의 고배율 공촛점 현미경 이미지를 나타낸다. 도 6e는 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치의 NSC-유래 신경세포 분화의 분석 결과를 나타낸다. 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 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.

[0051] 실시예

[0052] 실험 재료 및 실험 방법

[0053] 3D 미세유체 공동-배양 장치의 제조

[0054] 공지된 방법을 이용하여 2 단계 포토리소그래피(photolithography) 방법으로 챔버 및 브리지 채널을 제조하였다.²⁵ 3D 미세유체 공동-배양 장치를 제조하기 위해, AutoCAD 프로그램으로 챔버 및 브리지 채널을 디자인하였다. 브리지 채널을 제조하기 위해, SU-8 25 포토레지스트(photoresist)를 실리콘 웨이퍼 상에 스핀-코팅(1000 rpm, 60 초 및 40 Gm in thickness)하였다. 챔버를 제조하기 위해, SU-8 100을 SU-8 25 포토레지스트-패턴 기질 상에 스핀-코팅(1000 rpm, 60 초 및 250 Gm in thickness)하였다. PDMS[poly(dimethylsiloxane)] 전구 용액을 포토레지스트-패턴 실리콘 웨이퍼로 본뜨고, PDMS-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치를 글래스 슬라이드에 산소 플라즈마 처리(Femto Scientific, 대한민국)하여 접착하였다.

[0055]

GeIMA 하이드로젤 합성

[0056]

공지된 방법에 따라 광가교결합 GeIMA 하이드로젤을 합성하였다.^{26,27} 간단하게, 타입 A 돼지 피부 젤라틴을 50℃에서 교반하고, 완전히 용해할때까지 PBS(Phosphate Buffered Saline, GIBCO, 미국)을 혼합하였다. 2시간 동안 교반 조건에서 무수 메타크릴산(methacrylic anhydride)를 0.5 ml/분의 속도로 첨가하였다. 혼합물을 12-14 kDa 컷오프 투석 튜브에 넣고, 3-4일 동안 40℃의 조건에서 증류수로 투석하여, 염 및 메타크릴산을 제거하였다. 용액을 1주 동안 동결건조하고 -80℃에 보관하였다.

[0057]

주사형 전자 현미경

[0058]

주사형 전자 현미경(Scanning Electron Microscope; SEM)을 이용하여 GeIMA 하이드로젤의 구조를 분석하였다. 팽창된 하이드로젤을 냉동시키고 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 절단하고 터보 스프터 제피기(EMITECH, K575X)를 이용하여 단면을 백금으로 코팅하였다. 20 kV 고압에서 SEM 이미지를 획득하였다. 이미지 J 소프트웨어로 분석하여 다공성 및 측면의 정량하였다.

[0059]

NSC 및 암세포의 배양

[0060]

라미닌-코팅 배양 플라스크에서 2% B27 서플리먼트, 1% L-글루타민, 10 µg/ml 젠타마이신(Invitrogen, Auckland, 뉴질랜드) 및 10 유닛/ml 헤파린(Sigma, MO, 미국)이 첨가된 DMEM:F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지로 인간 NSC(ReN VM 세포주)를 5% CO₂, 37℃ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 플라스크에 부착된 세포를 떼기 위해 아큐테이스(accurtase)를 사용하였다. 또한, 인간 유방암 세포(breast carcinoma cell line; MCF7)를 배양하였다. 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% 페니실린-트랩토마이신이 첨가된 DMEM에서 배양하였다.

[0061]

GeIMA 하이드로젤 및 세포-캡슐화 콜라겐 겔의 로딩

[0062]

동결건조된 25 w/v% GeIMA 하이드로젤을 PBS 및 광개시제(photo-initiator)인 80℃의 0.5 w/v% 2-히드록시-1-(4-(히드록시에톡시)페닐)-2-메틸-1-프로판논(2-hydroxy-1-(4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone, Irgacure 2959, CIBA Chemicals)과 혼합하였다. 8 µl GeIMA 하이드로젤 용액을 3D 미세유체 공동-배양 장치의 c 챔버의 주입구에 투입하였고(도 1a), 자외선(360-480 nm 파장)을 20초 동안 조사하여 광-가교결합시켰다. 3D로 세포배양하기 위해, 얼음 상에서 2×10^6 세포/ml NSC 및 암 세포를 2 mg/ml 콜라겐 타입 I 겔에 캡슐화하였다. 6 µl 세포-캡슐화된 콜라겐 겔을 3D 미세유체 공동-배양 장치의 b 챔버 및 d 챔버의 주입구에 각각 투입하였다(도 1a). 세포를 30-40분 동안 37℃에서 항온배양하였다.

[0063]

면역세포화학법

[0064]

GeIMA 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치에서 6일 동안 배양한 후에, 세포를 실온에서 15분 동안 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정하였다. PBS로 세척한 후, 1% 트리톤 X-100(in PBS)를 30분 동안 세포에 처리하여 투과성을 부여하고 1% BSA(bovine serum albumin, Sigma, USA)로 1시간 동안 블로킹하였다. 세포를 1차 항체[항-신경 클래스 III β-튜불린(Tuj1), Stem Cell Technology, 캐나다]로 밤새 면역염색하고, 2차 항체(Alexa Fluor 488 고트 항-마우스 IgG 및 Alexa fluor 594 팔로이딘, Invitrogen, 미국)로 6시간 동안 실온에서 반응시켰다. 또한, DAPI(0.1 µg/ml)로 실온에서 30분동안 세포 핵을 염색하였다.

[0065]

결과 및 고찰

[0066]

GeIMA 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치의 제조

[0067]

광가교결합 가능한 GelMA 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치를 개발하였다(도 1). GelMA 하이드로젤-기반 3D 미세유체 장치는 2단계 포토리소그래피 공정에 의해 5 챔버(a 내지 e 챔버) 및 4 브리지 채널로 구성되어 제조된다(도 1a). 5 챔버(250 μm 두께)는 미세한 홈의 브리지 채널(40 μm 두께)로 연결된다(도 1b). 250 μm 두께의 챔버는 GelMA 하이드로젤 및 세포-캡슐화 콜라겐 타입 I 겔의 중합으로 채워진다. 40 μm 두께의 미세한 홈의 채널은 유체의 저항을 증가시킨다. UV로 마스크 필름을 통해 c 챔버의 GelMA 하이드로젤을 광가교결합하고, c 챔버 내부의 GelMA 하이드로젤이 선별적으로 광-패턴화됨을 확인하였다. GelMA 하이드로젤의 광-가교 후, 하이브리드 실링(sealing) 테이프를 c 챔버의 주입구 및 배출구를 밀폐하여 c 챔버의 주입구 및 배출구 내 용액의 증발을 차단하였다. c 챔버의 광-가교결합 GelMA 하이드로젤은 물리적 장벽으로 브리지 채널을 통한 분자 확산을 억제한다. 세포-캡슐화 콜라겐 타입 I 을 b 챔버 및 d 챔버에 로딩하였다. 신경세포 및 교질세포는 이전에 다구획 미세유체 장치에서 공동-배양되었다.²⁸ 중추신경계(central nervous system; CNS)의 액손을 6 주된 다구획 미세체널에서 분리하였다. 분리된 액손 층으로 정상세포 및 희돌기교세포 전구세포에 대한 공동-배양의 영향을 확인하였다. 이는 액손이 정상세포보다 위에 성장하여 정상세포는 액손을 밀어버림으로 인해, 정상세포에 의해 액손 층이 분열되었다. 반면에, 분리된 액손은 공동-배양되는 동안, 희돌기교세포 전구세포에서 성숙 미엘린(myelin) 단백질이 높게 발현되었다. 그러므로, 다구획 미세유체 배양 장치는 액손-글리아 상호작용 및 고속대량 약물스크리닝에 많은 이점을 갖는다. 신경세포 및 정상세포는 근위축성 측색 경화증과 유사한 미세유체 장치에서 공동-배양되었다.²⁹ 미세유체 장치에서 직접 세포-세포 연결 없이 신경세포를 감염된 정상세포와 공동배양하여 세포-세포 대사 변화(cell-cell metabolic gradients)를 생성하였다. 이는 신경세포와 공동-배양된 감염 정상세포의 밀도가 크게 감소됨을 나타내었다. 신경세포-정상세포 공동-배양 미세유체 장치에서 글루타메이트 변화가 생성되어, 글루타메이트의 적당한 처리는 신경세포의 사멸에 영향을 주지 않았다. 이러한 이전의 신경세포-교질세포 상호작용을 조사한 미세유체 공동-배양 장치는 신경줄기세포 및 암 세포의 공동-배양을 위한 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 장치가 고려되지 않았다.

[0068]

다공성 및 분자 확산에 대한 GelMA 하이드로젤 농도의 영향

[0069]

다공성에 대한 GelMA 하이드로젤 농도의 영향을 확인한 결과, 구멍 크기는 GelMA 하이드로젤 농도와 반비례함을 나타내었다(도 2). SEM 이미지는 25 w/v% GelMA 하이드로젤의 다공성으로, 5 w/v% 하이드로젤과 비교하여 균일한 크기 및 형태를 나타낸다(도 2a 내지 2c). 5 w/v% GelMA 하이드로젤의 구멍 크기는 34 μm 인데 반해, 25 w/v% GelMA 하이드로젤의 구멍 크기는 4 μm 였다(도 3a). 25 w/v% GelMA 하이드로젤의 다공성은 원형(중형비=1)인 반면, 5 w/v% GelMA 하이드로젤은 타원형(중형비=1.9, 도 3b). 또한, 분자 확산에 대한 GelMA 하이드로젤 농도의 영향을 조사하였다(도 4). FITC(fluorescein isothiocyanate)-텍스트란(20 kDa)을 b 챔버에 로딩하고 c 챔버 내 5-25 w/v% Gel을 광-패턴화하였다. 6일 동안, 25 w/v% GelMA 하이드로젤은 분자 확산을 완전히 억제하였고, 이는 25 w/v% GelMA 하이드로젤이 c 챔버에서 물리적 장벽으로 사용될 수 있음을 의미한다(도 4b). 대조적으로, 5-15 w/v% 하이드로젤-기반 미세유체 챔버에서 FITC-텍스트란 용액은 쉽게 확산되었다. 흥미롭게도, 5 w/v% GelMA 하이드로젤(34 μm 다공성)을 c 챔버에 주입한 경우에, b 챔버 내 FITC-텍스트란 용액은 하루만에 d 챔버로 거의 확산되었다. 대조적으로, 25 w/v% GelMA 하이드로젤(4 μm 다공성)을 c 챔버에 주입한 경우에, 6일 동안 b 챔버의 FITC-텍스트란 용액은 d 챔버로 거의 확산되지 않았다. 결과적으로, 25 w/v% GelMA 하이드로젤의 4 μm 작은 다공 및 챔버(40 μm 두께) 및 브리지 채널(250 μm 두께) 사이의 210 μm 두께 겹은 분자 확산을 억제하였고, 이는 이형 세포 사이의 교차-오염(cross-contamination)이 없음을 의미한다. 팽창 정도에 대한 GelMA 하이드로젤 농도의 영향은 이전에 조사되었다.²⁶ 이는 질량 팽창 비는 GelMA 하이드로젤의 농도와 반비례한다고 설명하며, 15 w/v% GelMA 하이드로젤의 팽창비는 5 w/v% GelMA 하이드로젤과 비교하여 50% 감소되었다. 이는 고농도 GelMA 하이드로젤은 분자 확산을 억제함을 의미한다. GelMA 하이드로젤은 2중층 미세유체 장치에 세포-세포 상호작용을 조절하기 위해 사용되었다.³⁰ 다공성 막에서 판막 내피세포를 배양하고, 내피하 3D 기질로 이용된 GelMA 하이드로젤 내 캡슐화된 판막 사이세포를 상기 다공 막 상에 배양하였다. GelMA 하이드로젤은 높은 물리적 안정성 및 생리학-관련 탄성계수를 나타내었다. 이는 판막 사이세포와 판막 내피세포의 파라크린 상호작용에 대한 전단 응력(shear stress)의 영향은 전단 응력이 적용되었을 때, 내피세포가 사이세포의 병에 의한 근섬유아세포(myofibroblast)로의 분화를 억제함을 나타낸다. 그러나, 이러한 연구는 미세유체 장치 내 물리적 장벽으로서의 GelMA 하이드로젤을 고려하지 않았다.

[0070]

3D 미세유체 장치 내 NSC 및 암 세포의 공동-배양

[0071]

재생 조직 구조물에 응용하기 위한 NSC 및 암 세포의 공동-배양은 많은 관심을 받고 있다. NSC 및 암 세포를 6일 동안 2D 표면 및 3D 콜라겐 겔에서 공동-배양하였다(도 5). 공촛점 현미경 이미지는 3D 콜라겐 겔 내 배양된 NSC 및 암 세포와 2D 표면에서 배양된 NSC 및 암 세포의 차이를 나타낸다. 2D 표면에 배양된 NSC 및 암 세포는 상대적으로 양극화된(도 5a 및 5b) 반면, 3D 콜라겐 겔에서 배양된 NSC 및 암 세포의 형태는 원형이었다(도 5c 및 5d). 동시에, 3D 미세유체 공동-배양 장치 내 NSC 및 암세포의 반응에 대한 3D 콜라겐 겔의 영향을 조사하였다(도 6). 콜라겐 타입 I 겔에 캡슐화된 NSC 및 암 세포를 각각 b 및 d 챔버에 로딩하였다. 브리지 채널로의 배지 확산을 차단하기 위해 c 챔버에 25 w/v% GelMA 하이드로젤을 로딩하였다. 공촛점 현미경 이미지는 콜라겐 겔-로딩 b 챔버 내 높게 발현된 Tuj1-양성 신경세포 및 콜라겐-겔 로딩 d 챔버에 공동-배양된 팔로이딘-양성 암 세포를 나타낸다(도 6a 및 6b). 결과적으로, 25 w/v% GelMA 하이드로젤을 물리적 장벽으로 사용하여기 때문에, NSC 및 암세포의 배양 배지는 교차-오염이 일어나지 않은 것이다. 콜라겐 겔-로딩 b 챔버 내 배양된 NSC로부터 Tuj1-양성 신경세포의 신경돌기 생성을 확인하였다(도 6c). 면역세포화학 분석법은 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치 내 Tuj1-양성 신경세포로 분화된 NSC는 66% 정도로 나타났다(도 6e). 암 치료를 연구하기 위해 이전에 유방암세포 및 신경세포 또는 NSC 사이의 상호작용이 조사되었다.^{31,32} 예컨대, 신경세포 및 유방암세포의 역기능에 대한 RhoA 서브패밀리-기반 저분자의 영향이 연구되었다.³¹ Rho-특이 억제제인 로신(rhosin)은 유방암 세포 MCF7-유래 맘모스피어(mammosphere) 형성을 억제하였고, 유방암 세포의 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 역기능을 보여주었다. 이는 로신이 암 전이와 직접적으로 관련이 있는 RhoA 또는 RhoC의 활성을 억제하여 유방암 세포의 이동(migration), 침입(invation) 및 전이(metastasis)를 억제함을 의미한다. 대조적으로, 로신은 NGF(Nerve Growth Factor)의 존재 하에 PC21 신경세포의 신경 돌기의 성장을 향상시킨다. 인간 유도만능줄기세포-유래 NSC는 유방암 세포의 유전자 치료에 적용하기 위해 사용되었다.³² 렌티바이러스 형질도입법을 이용하여 인간 섬유아세포 유래 인간 유도만능줄기세포 유래의 NSC를 제조하였다. 암 유전자 치료를 위해, 인간 유도만능줄기세포-유래 NSC를 키나아제(kinase) 자살 유전자(suicide gene)를 갖는 배클로바이러스 벡터로 형질도입하였다. 이는 NSC가 마우스 유방암으로 이동하고 유방암의 증식 및 전이를 억제함을 성공적으로 입증하였다.

[0072]

결론

[0073]

NSC 및 암세포를 공동-배양하기 위한 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 장치를 개발하였다. 다공성에 대한 광가교결합 GelMA 하이드로젤 농도의 영향을 조사하여 25 w/v% GelMA 하이드로젤은 4 μ m 직경의 원형을 확인하였다. 3D 미세유체 장치에서 25 w/v% GelMA 하이드로젤은 분자 확산 및 교차 오염을 억제하는 물리적 장벽으로 사용하였기 때문에, 6일 동안 암세포를 공동-배양하여 66% NSC가 Tuj1-양성 신경세포로 분화함을 성공적으로 입증하였다. 따라서, 광가교결합 하이드로젤-기반 3D 미세유체 공동-배양 장치는 암 세포에 의해 손상된 신경계의 신경 재생을 연구하는데 기여할 것이다.

[0074]

참고문헌

[0075]

1. D. C. Lie, H. Song, S. A. Colamarino, G. L. Ming and F. H. Gage, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004, 44, 399-421.

[0076]

2. I. Singec, R. Jandial, A. Crain, G. Nikkhah and E. Y. Snyder, *Annu. Rev. Med.*, 2007, 58, 313-328.

[0077]

3. S. Temple, *Nature*, 2001, 414, 112-117.

[0078]

4. W. Ma, W. Fitzgerald, Q. Y. Liu, T. J. O'Shaughnessy, D. Maric, H. J. Lin, D. L. Alkon and J. L. Barker, *Exp. Neurol.*, 2004, 190, 276-288.

[0079]

5. K. Brannvall, K. Bergman, U. Wallenquist, S. Svahn, T. Bowden, J. Hilborn and K. Forsberg-Nilsson, *J. Neurosci. Res.*, 2007, 85, 2138-2146.

[0080]

6. O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, R. Langer and N. A. Peppas, *Acc. Chem. Res.*, 2010, 43, 419-428.

[0081]

7. K. Y. Lee and D. J. Mooney, *Chem. Rev.*, 2001, 101, 1869-1879.

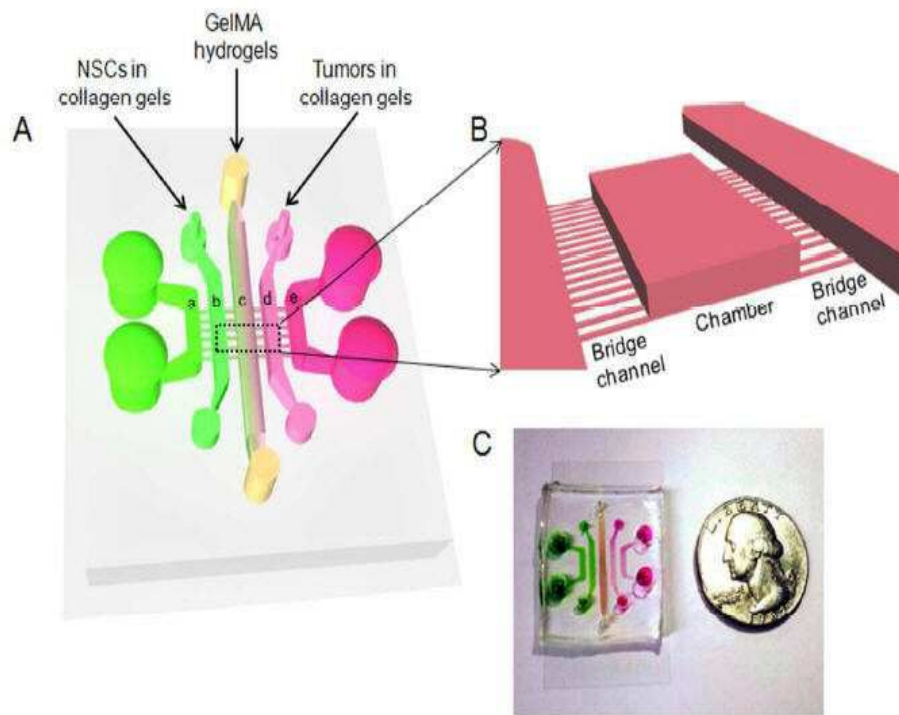
- [0082] 8. C. Y. Wan, M. Frydrych and B. Q. Chen, *Soft Matter*, 2011, 7, 6159-6166.
- [0083] 9. I. De Paepe, H. Declercq, M. Cornelissen and E. Schacht, *Polym. Int.*, 2002, 51, 867-870.
- [0084] 10. S. R. Shin, H. Bae, J. M. Cha, J. Y. Mun, Y. C. Chen, H. Tekin, H. Shin, S. Farshchi, M. R. Dokmeci, S. Tang and A. Khademhosseini, *ACS Nano*, 2012, 6, 362-372.
- [0085] 11. N. D. Leipzig, R. G. Wylie, H. Kim and M. S. Shoichet, *Biomaterials*, 2011, 32, 57-64.
- [0086] 12. C. R. Nuttelman, M. C. Tripodi and K. S. Anseth, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, 68, 773-782.
- [0087] 13. C. A. DeForest, B. D. Polizzotti and K. S. Anseth, *Nat. Mater.*, 2009, 8, 659-664.
- [0088] 14. H. Li, A. Wijekoon and N. D. Leipzig, *PloS One*, 2012, 7, e48824.
- [0089] 15. S. K. Seidlits, Z. Z. Khaing, R. R. Petersen, J. D. Nickels, J. E. Vanscoy, J. B. Shear and C. E. Schmidt, *Biomaterials*, 2010, 31, 3930-3940.
- [0090] 16. E. M. Chandler, C. M. Berglund, J. S. Lee, W. J. Polacheck, J. P. Gleghorn, B. J. Kirby and C. Fischbach, *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108, 1683-1692.
- [0091] 17. S. J. Morrison and A. C. Spradling, *Cell*, 2008, 132, 598-611.
- [0092] 18. B. G. Chung, L. A. Flanagan, S. W. Rhee, P. H. Schwartz, A. P. Lee, E. S. Monuki and N. L. Jeon, *Lab Chip*, 2005, 5, 401-406.
- [0093] 19. J. M. Lee, J. E. Kim, J. Borana, B. H. Chung and B. G. Chung, *Electrophoresis*, 2013, 34, 1931-1938.
- [0094] 20. S. Han, K. Yang, Y. Shin, J. S. Lee, R. D. Kamm, S. Chung and S. W. Cho, *Lab Chip*, 2012, 12, 2305-2308.
- [0095] 21. B. Patra, Y. H. Chen, C. C. Peng, S. C. Lin, C. H. Lee and Y. C. Tung, *Biomicrofluidics*, 2013, 7, 54114.
- [0096] 22. S. J. Curran, R. Chen, M. Oates and J. A. Hunt, *Tissue Eng.*, 2006, 12, 1024-1024.
- [0097] 23. H. S. Shin, H. J. Kim, S. K. Min, S. H. Kim, B. M. Lee and N. L. Jeon, *Biotechnol. Lett.*, 2010, 32, 1063-1070.
- [0098] 24. Y. S. Torisawa, B. Mosadegh, G. D. Luker, M. Morell, K. S. O'Shea and S. Takayama, *Integr. Biol.*, 2009, 1, 649-654.
- [0099] 25. A. M. Taylor, S. W. Rhee, C. H. Tu, D. H. Cribbs, C. W. Cotman and N. L. Jeon, *Langmuir*, 2003, 19, 1551-1556.
- [0100] 26. J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar and A. Khademhosseini, *Biomaterials*, 2010, 31, 5536-5544.
- [0101] 27. A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen and H. Berghmans, *Biomacromolecules*, 2000, 1, 31-38.
- [0102] 28. J. Park, H. Koito, J. Li and A. Han, *Lab Chip*, 2012, 12, 3296-3304.
- [0103] 29. A. Kunze, S. Lengacher, E. Dirren, P. Aebischer, P. J. Magistretti and P. Renaud, *Integr. Biol.*, 2013, 5, 964-975.
- [0104] 30. M. B. Chen, S. Srigunapalan, A. R. Wheeler and C. A. Simmons, *Lab Chip*, 2013, 13, 2591-2598.
- [0105] 31. X. Shang, F. Marchioni, N. Sipes, C. R. Evelyn, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, W. Seibel, M. Wortman and Y. Zheng, *Chem. Biol.*, 2012, 19, 699-710.
- [0106] 32. J. Yang, D. H. Lam, S. S. Goh, E. X. Lee, Y. Zhao, F. C. Tay, C. Chen, S. H. Du, G. Balasundaram, M. Shahbazi, C. K. Tham, W. H. Ng, H. C. Toh and S. Wang, *Stem Cells*, 2012, 30, 1021-1029.

[0107]

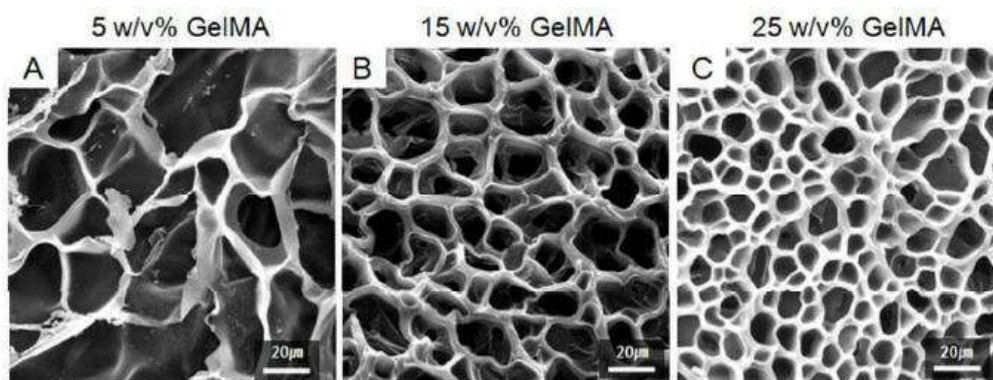
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

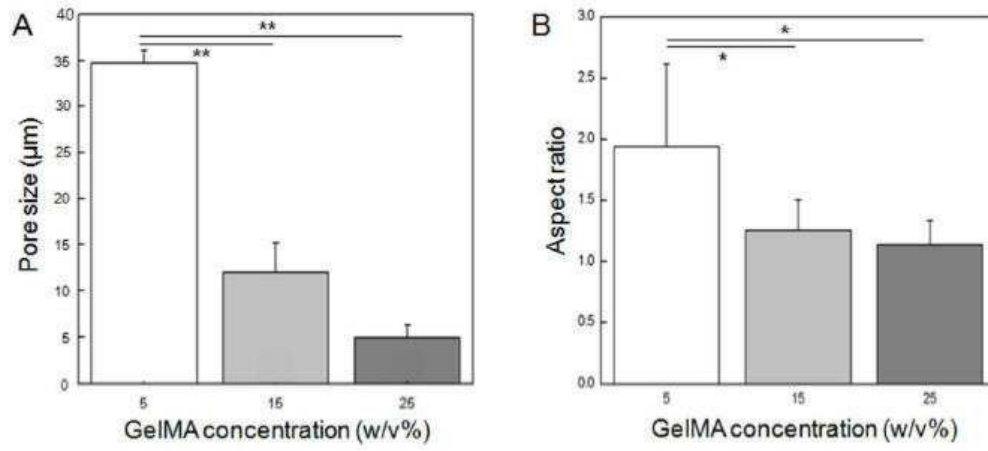
도면1



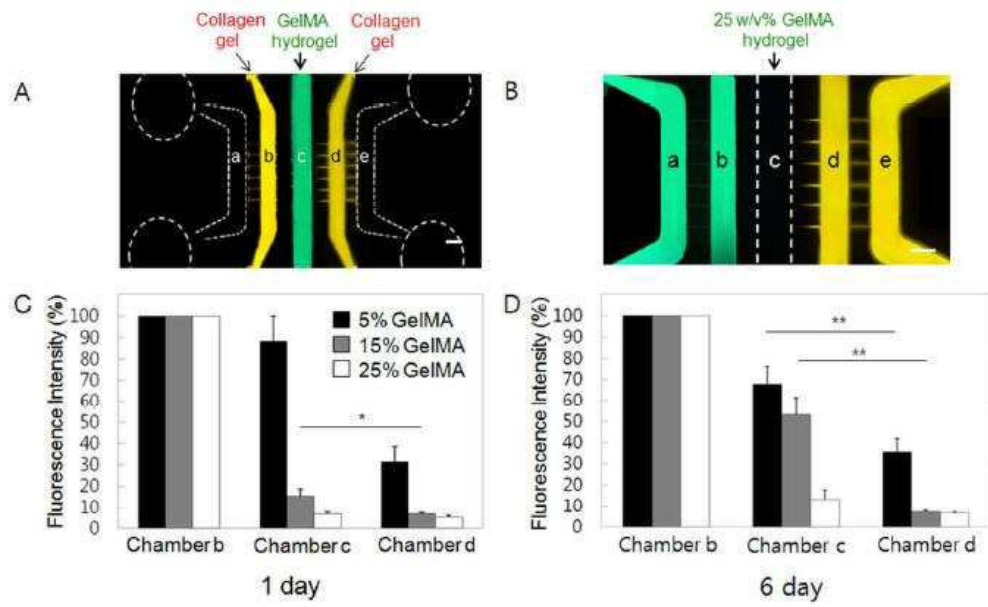
도면2



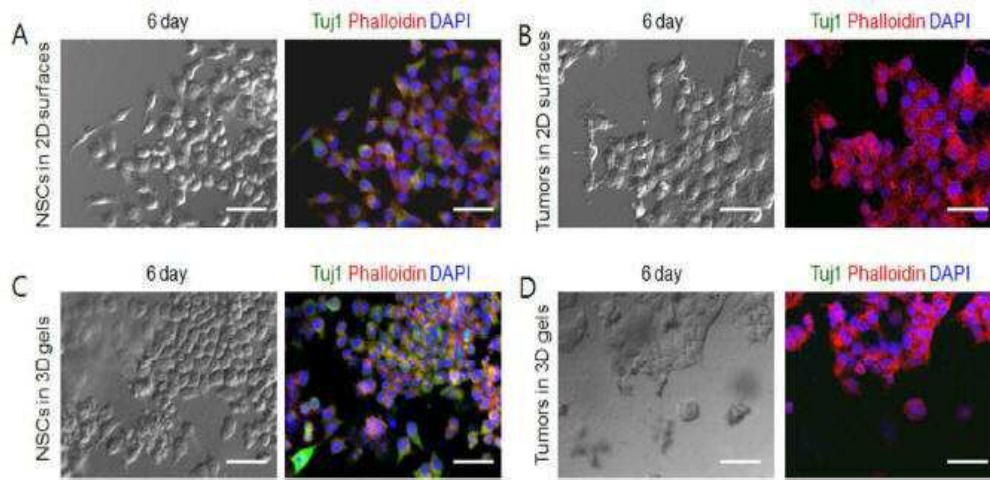
도면3



도면4



도면5



도면6

