

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0053484 (43) 공개일자 2018년05월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/0793 (2010.01) C12N 13/00 (2017.01) (52) CPC특허분류 C12N 5/0619 (2013.01) C12N 13/00 (2013.01) (21) 출원번호 10-2016-0150508 (22) 출원일자 2016년11월11일 심사청구일자 2016년11월11일		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 정봉근 경기도 과천시 관문로 143 1110동 1004호 (중양동, 래미안에코팰리스아파트) 이종민 서울특별시 은평구 갈현로9길 16 (역촌동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 윤대웅, 공병욱

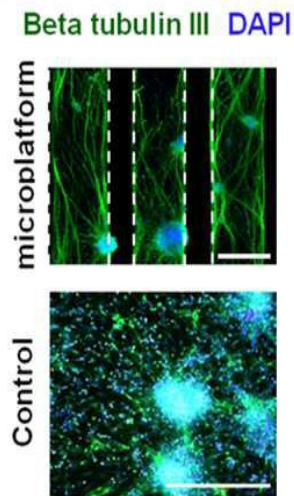
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 패턴닝된 하이드로젤을 이용한 신경줄기세포의 분화 방법

(57) 요약

본 발명은 신경줄기세포의 분화방법을 제공한다. 본 발명은 패턴닝된 하이드로젤을 이용하여 신경줄기세포로부터 신경세포로의 최적화된 분화 조건을 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 2506/08 (2013.01)

C12N 2533/00 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2535/00 (2013.01)

(72) 발명자

문주윤

경기도 하남시 하남대로802번길 111 306동 1903호
(신장동, 에코타운3단지아파트)

김태현

서울특별시 노원구 동일로180길 47-9 지하1층 (공
릉동, 청화주택)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A7B4910652

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 나노소재원천기술개발사업

연구과제명 고풍이 검출을 위한 미세유체칩 개발

기 여 율 40/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.08.01 ~ 2017.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A6A1A03012845

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업 (중점연구소 사업)

연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발

기 여 율 30/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A6A3A11931838

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 리서치펠로우

연구과제명 신경재생 연구를 위한 웨어러블 디바이스 기술 개발

기 여 율 30/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 신경줄기세포의 분화 방법:

- (a) 신경줄기세포를 배양하여 신경구(neurosphere)를 유도하는 단계;
- (b) 상기 신경구를 생체적합성 고분자 및 전도성 나노와이어로 구성된 하이드로젤이 150-250 μm 간격으로 패터닝된 세포 배양 기관 상에 씨딩하는 단계;
- (c) 상기 세포 배양 기관에 전압을 인가하여 신경세포로 분화시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 신경구는 100-150 μm 크기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(PEG)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 전도성 나노와이어는 금속 나노와이어인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 금속 나노와이어는 실버 나노와이어, 구리 나노와이어, 금 나노와이어 또는 알루미늄 나노와이어인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 하이드로젤은 생체적합성 고분자 및 전도성 나노와이어가 8-12:1의 혼합비로 구성되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 전압은 8-12 V(voltage)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 세포 배양 기관은 4-6 V/ cm^2 의 전기장 세기를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 패터닝된 하이드로젤을 이용한 신경줄기세포의 분화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 신경 줄기 세포는 중추신경계에서 유래되어 자기 증식 능력을 가지고 있으면서, 분화된 세포의 특성을 가지지 않으며, 신경계의 여러 가지 세포로 분화 할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 신경 줄기세포는 신경 조직에 손상이 발생하면 손상된 신경 조직으로 변하는 분화의 유연성을 가지고 있으며, 주입된 몸 안에서 자가 재생산을 할 수 있으며 면역성에 안전성을 가지고 있다. 신경 세포의 죽음은 신경퇴행성 질병 및 극심한 중추신경계 질병에서 나타나는 특징이다. 또한 세포의 감소는 중추신경계의 손상된 세포의 교체나 치료를 위한 재생능력의 부재에 의해 일어난다. 이러한 문제를 극복하기 위한 한 가지 방법은 재생산이 가능한 신경줄기세포를 이용한 세포 대체 치료이다.

[0004] 이러한 세포 치료 조건을 최적화하기 위하여 반도체 제조 공정인 미세가공 기술을 이용하여 세포 및 조직 배양 연구를 수행할 수 있다. 미세 가공기술은 다양한 분야에서 연구가 활발하게 진행되고 있다. 효율성과 생산성이 뛰어나며, 저비용으로 구현이 가능하다. 또한, 세포나 조직 연구에 적합한 마이크로 구조체를 제작할 수 있기 때문에 신경세포 주위의 미세환경을 정밀하게 조절할 수 있다. 신경 줄기세포의 증식과 분화는 성장인자, 신호물질 등 미세환경의 영향을 크게 받으므로 미세 환경을 조절하는 것이 중요하다.

[0005] 3차원적 구성에서 줄기 세포 연구를 위한 기존의 방법은 정확도와 재현성 있는 방법으로 복잡한 환경을 만들기 어렵기 때문에 한계가 있다. 따라서 기존의 패터닝 관련 기술과 비교하였을때 보다 다양한 조건을 최적화 할 수 있는 기술이 필요하다.

[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.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Serena E et al. Experimental cell research 2009, 315(20):3611-3619.
- (비특허문헌 0002) Woo DG et al. Biomaterials 2009, 30(29):5631-5638.
- (비특허문헌 0003) Pires F et al. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 2015, 1850(6):1158-1168.
- (비특허문헌 0004) Prabhakaran MP et al. Journal of bioscience and bioengineering 2011, 112(5):501-507.
- (비특허문헌 0005) Huang YJ et al. Small 2012, 8(18):2869-2877.
- (비특허문헌 0006) Liu X et al. Journal of neural engineering 2009, 6(6):065002.
- (비특허문헌 0007) Yamada M et al. Stem Cells 2007, 25(3):562-570.
- (비특허문헌 0008) Choi YY et al. Biomaterials 2010, 31(15):4296-4303.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 패터닝된 하이드로젤을 이용하여 신경줄기세포로부터 신경세포로의 분화 조건을 최적화하고자 노력하였다. 그 결과, 일정 간격을 갖도록 패터닝된 하이드로젤을 이용하는 경우에, 신경줄기세포가 신경세포로 더 잘 분화함을 확인하고, 신경줄기세포의 공간적 및 전기적 자극의 조건을 최적화함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 신경줄기세포의 분화 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 신경줄기세포의 분화 방법을 제공한다:

[0016] (a) 신경줄기세포를 배양하여 신경구(neurosphere)를 유도하는 단계;

[0017] (b) 상기 신경구를 생체적합성 고분자 및 전도성 나노와이어로 구성된 하이드로젤이 150-250 μm 간격으로 패터닝된 세포 배양 기관 상에 씨딩하는 단계; 및

[0018] (c) 상기 세포 배양 기관에 전압을 인가하여 신경세포로 분화시키는 단계;

[0019] (d) 상기 신경세포를 수득하는 단계.

[0021] 본 발명자들은 패터닝된 하이드로젤을 이용하여 신경줄기세포로부터 신경세포로의 분화 조건을 최적화하고자 노력하였다. 그 결과, 일정 간격을 갖도록 패터닝된 하이드로젤을 이용하는 경우에, 신경줄기세포가 신경세포로 더 잘 분화함을 확인하고, 신경줄기세포의 공간적 및 전기적 자극의 조건을 최적화하였다.

[0023] 본 발명의 신경줄기세포의 분화 방법을 단계별로 설명한다.

[0025] 단계 (a): 신경구의 유도

[0026] 먼저, 신경줄기세포를 배양하여 신경구를 유도한다.

[0027] 본 명세서에서 용어 “신경줄기세포”는 신경세포(neuron), 성상교세포(astrocyte), 희돌기세포(oligodendrocyte)등 어떠한 중추신경계를 구성하는 세포로도 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화세포를 의미한다.

[0028] 상기 신경줄기세포의 구체적인 분리 방법은 미국등록특허 5,654,183에 개시되어 있고, 이 문헌은 본 명세서 참조로써 삽입된다. 신경줄기세포는 bFGF (basic fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), 또는 FGF (fibroblast growth factor)의 성장 인자를 적합한 농도 범위 예컨대 5-100 ng/ml의 범위로 배지에 첨가하여 배양할 수 있다.

[0029] 본 발명의 신경줄기세포는 바람직하게는 인간의 조직으로부터 분리 및 배양된 초대 배양 줄기세포(primary cultured neural stem cell)일 수 있으며, 또는 상기 초대 배양 줄기세포에 종양 유전자(예컨대, v-myc 유전자)를 발현 가능한 형태로 포함한 벡터를 도입하여 확립된 불사멸화된 줄기세포주일 수 있다.

[0030] 상기 신경줄기세포를 세포-부착기질(cell-adherent substrates)이 결핍된 배양배지에서 부유 상태로 배양하여 신경구를 수득할 수 있다. 상기 신경구는 신경줄기세포가 응집(aggregation)된 형태를 갖는다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 신경구는 100-150 μm 의 크기를 갖는다. 이는 패터닝된 하이드로젤에서 배양하기 적합한 크기이다.

[0032] 본 발명은 상기 하이드로젤 패터닝된 세포 배양 기관 상에 세포가 부착할 수 있도록 세포외기질(예컨대, 라미닌 및 폴리-L-오리니틴)을 코팅하는 단계를 추가적으로 포함한다.

- [0034] 단계 (b): 신경구의 씨딩
- [0035] 다음, 상기 신경구를 생체적합성 고분자 및 전도성 나노와이어로 구성된 하이드로젤이 150-250 μm 간격으로 패터닝된 세포 배양 기관 상에 씨딩한다.
- [0036] 본 발명의 주요한 특징은 하이드로젤이 150-250 μm 간격으로 패터닝된 세포 배양 기관을 이용하여 신경줄기세포를 분화시키는 점이다.
- [0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 하이드로젤은 160-240 μm , 170-230 μm , 180-220 μm 또는 190-210 μm 간격을 갖는다.
- [0038] 상기 기관은 필름, 유리, 플라스틱 또는 실리콘이다.
- [0039] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 기관은 필름이다. 본 발명자는 본 발명에 의해 제조된 신경세포의 활용을 용이하게 하기 위해, 유연성을 갖는 기관 상에 하이드로젤을 패터닝하여 신경구를 분화시켰다.
- [0040] 상기 하이드로젤이 패터닝된 간격은 신경구의 분화 효율에 영향을 미친다. 신경구의 크기에 적합한 패턴일수록 신경세포로의 분화가 더 잘 이루어진다.
- [0041] 상기 하이드로젤은 생체적합성 고분자 및 전도성 나노와이어로 구성된다
- [0042] 상기 생체적합성 고분자는 당업계에 공지된 어떠한 생체적합성 고분자도 가능하나, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 텍스트란, 알부민, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌이민, 폴리락틱글라이코락산(PLGA), 폴리락틱산, 폴리락타이드, 폴리글라이콜릭산, 폴리아미노산, 폴리아세탈, 폴리옥사칼본에이트, 폴리칼본에이트, 폴리칼보락톤 폴리아크릴산, 폴리메타아크릴산, 폴리사카라이드, 폴리케탈, 폴리에테르, 폴리아마이드, 폴리말레익안하이드라이드, 폴리메틸비닐에테르 및 상기 고분자의 공중합체로 구성된 군으로부터 선택되는 생체적합성 고분자이다.
- [0043] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 하이드로젤을 구성하는 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌글리콜이다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전도성 나노와이어는 전도성 나노와이어는 금속 나노와이어이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 금속 나노와이어는 실버 나노와이어, 구리 나노와이어, 금 나노와이어 또는 알루미늄 나노와이어이다.
- [0045] 예를들어, PEG와 다른 물질을 섞고 난 뒤 UV를 조사하여 광가교결합을 할 때 다른 물질의 부피가 크게 되면 광가교결합을 방해 받게 된다. 이때 나노와이어는 부피에 비하여 큰 표면적을 지니고 있으므로, 광가교결합을 방해하지 않으며 높은 전도성을 가지고 있어, 본 발명의 패터닝된 하이드로젤의 제조에 적합하다.
- [0046] 상기 단계 (b)의 하이드로젤은 생체적합성 고분자 및 전도성 나노와이어가 8-12:1의 비율로 구성된다.
- [0047] 실시예에 따르면, 10:1부터 PEG와 실버나노와이어를 혼합한 액체가 광가교결합을 형성하고, 10:1의 비율이 넘어갈 경우 예를 들어 5:1일 때는 PEG가 젤레이션 되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 하이드로젤은 생체적합성 고분자 및 전도성 나노와이어가 9-12:1, 10-12:1, 9-11:1 또는 10:1의 비율로 구성된다.
- [0051] 단계 (c): 신경세포로 분화
- [0052] 다음, 상기 세포 배양 기관에 전압을 인가하여 신경세포로 분화시킨다.
- [0053] 본 발명자들은 신경줄기세포의 분화에 적합한 전압 조건을 찾고자 하였다.
- [0054] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전압은 8-12 V(voltage)이다.
- [0055] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 전압은 9-12 V, 9-11 V 또는 10 V이다.
- [0056] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 1 V, 10 V 및 15 V의 전압 조건과 비교하여, 10 V의 조건에서 신경줄기세포의 분화가 더 잘 이루어짐을 확인하였다.

[0057] 상기 세포 배양 기판에 인가된 전압은 cm^2 면적당 전기장의 세기가 가해진 전압의 절반이다. 예로 들면 10 V를 인가하는 경우 상기 세포 배양 기판에 인가되는 전압은 약 5 V/ cm^2 이다.

[0058] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)의 세포 배양 기판은 4-6 V/ cm^2 의 전기장 세기를 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 전기장의 세기는 4-5, 5-6 또는 5 V/ cm^2 이다.

[0060] 단계 (d): 신경세포의 수득

[0061] 마지막으로, 상기 신경세포를 수득한다.

발명의 효과

[0063] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0064] (a) 본 발명은 신경줄기세포의 분화방법을 제공한다.

[0065] (b) 본 발명은 패터닝된 하이드로젤을 이용하여 신경줄기세포로부터 신경세포로의 최적화된 분화 조건을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1a는 전도성 하이드로젤의 패터닝 방법 및 전기자극을 모식화이다. 도 1b는 전도성 하이드로젤이 패터닝된 PET 필름 이미지이다.

도 2는 전도성 하이드로젤을 구성하는 PEG 및 AgNW(실버나노와이어)의 이미지이다. 도 2a 내지 2c는 각각 10% PEG, AgNW 및 상기 10% PEG 및 AgNW의 혼합물의 SEM 이미지이고, 도 2d는 AgNW를 포함하는 혼합물의 성분분석 결과이다.

도 3a 내지 3d는 신경줄기세포에 대한 전기자극에 대하여 시뮬레이션을 이용하여 전기장을 측정한 결과이다. 도 3a는 함수발생기를 이용한 2시간 간격 전기자극 함수를 나타내고, 도 3b는 6웰 플레이트 내 전기장 형성의 시뮬레이션을 나타낸다. 도 3c는 6웰 플레이트 내 위치에 따른 전기장의 분포를 나타내고, 도 3d는 전압에 따른 면적당 전기장 세기를 나타낸다.

도 4는 전기자극에 의한 신경구의 신경세포로의 분화를 면역염색을 통해 확인한 결과이다. 200 μm 간격의 패터닝된 하이드로젤에 10V의 전압을 인가하여 신경구의 분화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 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.

[0070] 실시예

[0071] 실험재료 및 실험방법

[0072] 패터닝된 하이드로젤의 제조

[0073] 하이드로젤 패터닝 기술을 이용하여 줄기세포의 분화를 유도하는 기술을 개발하였다. 줄기세포에 전기적인 자극을 가하게 되면 신경세포로의 분화를 유도할 수 있기 때문에 우리는 전기 자극을 주기 위한 디바이스를 제작하기 위하여 반도체 제조 공정인 포토리소그래피 기술을 이용하였다. 포토레지스트(photoresist)가 패터닝된 실리콘 웨이퍼를 이용하여 poly(dimethylsiloxane)(PDMS)로 마이크로 몰드를 제작하였고, poly(ethylene glycol)(PEG)(1000Da, Sigma-Aldrich)와 전도성을 지니고 있는 실버나노와이어(AgNW, Nanopyxis CO.,Ltd., 은 0.5-2.0 %, 아세톤 2.5-10 %, 이소프로필알코올 87.85-96.85 % 및 폴리비닐피롤리돈 0.15 %로 구성)를 사용하

였다. 상기 PEG와 실버나노와이어를 10:1의 비율로 혼합하여 혼합물을 제조한다.

[0074] 1w/v% 광개시제(photoinitiator)인 2-하이드록시-2-메틸 프로피오페논(2-hydroxy-2-methyl propiophenone, Sigma-Aldrich Co., MO, 미국)을 10w/v% PEG-diacrylate(1000 Da)와 혼합한 뒤 실버나노와이어 수용액과 10:1의 비율로 혼합하여 PDMS 마이크로몰드를 제조한다. 제작된 PDMS 마이크로몰드를 사용하여 유연한(flexible) PET 필름(100micron, Filmbank) 위에 150, 200, 300 μm 의 간격으로 각각 패터닝하여 디바이스를 제작하였다. 제작방법은 PDMS 마이크로몰드에 인렛(inlet) 및 아웃렛(outlet) 홀을 펀치로 뚫어주고 PDMS와 PET 필름을 접착시킨 뒤 파이펫을 이용하여 PEG/AgNW가 혼합된 물질을 인렛 홀에 주입하고 UV를 조사하여 광가교결합(photo-crosslink)을 하여 패터닝을 진행하였다(도 1). 상기 패터닝된 하이드로젤은 바닥면은 PET필름이고 벽면은 전도성 물질인 은나노와이어가 포함된 하이드로젤로 이루어지게 된다. 이 후 패터닝된 디바이스 표면에 ECM(extracellular matrix) 기질인 라미닌(laminin)과 폴리-L-오리니틴(poly-L-orinithine; PLO)을 사용하여 줄기세포의 분화를 유도하도록 코팅처리를 진행하였다. 상세하게는, 마이크로피펫을 이용하여 200 μl 의 PLO 0.1 mg/ml를 패턴 위에 처리한 뒤 37°C 인큐베이터에 6시간 이상 항온반응 하였다. 세포분화를 유도하기 위해 PLO가 처리된 패턴 위에 0.02 mg/ml 라미닌을 200 μl 처리하여 37°C 인큐베이터에 2시간 이상 항온반응 하였다.

[0076] 신경줄기세포의 배양

[0077] bFGF 및 EGF를 포함하는 N2 배지(1% 무혈청 N2, 2% B27 보충물 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 in DMEM/F12)에 신경줄기세포(Pregnant female C57BL/6 mice cerebral cortex from brain at E12 were purchased from DAEHAN BIOLINK,)를 3일 동안 배양하여 세포가 신경구를 형성하도록 하였다. 3일 동안 세포 배양 디시에서 배양을 하게 되면 신경줄기세포들은 서로 뭉쳐 자연스럽게 신경구 형태를 갖게 된다. 3일 동안 배양했을 경우 신경구의 크기는 약 100-150 마이크로미터이다.

[0078] 상기 신경구를 패터닝된 하이드로젤 상에 씨딩한다. 6 웰 플레이트에 3일 동안 배양된 신경구들을 파이펫을 이용하여 패터닝된 하이드로젤 상에 씨딩을 한 후 가볍게 플레이트를 흔들어 패턴 사이로 신경구들이 부착될 수 있도록 한다.

[0080] 신경줄기세포의 분화 유도

[0081] 패터닝된 하이드로젤 상에 씨딩된 신경구를 포함하는 배양물을 7일 동안 AC 전력공급 및 함수발생기를 사용하여 2시간 간격으로 신경줄기세포에 각각 1 V(voltage), 5 V, 10 V, 15 V의 전기적 자극을 주어 어떤 전압에서 신경세포로 잘 분화하는지 실험을 진행하였다.

[0083] 면역염색

[0084] 패터닝된 하이드로젤 상에서 분화된 신경구를 신경마커로 면역 염색하였다. 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 30분 동안 실온 처리하여 신경구를 고정하였다. 다음, 1% 트리톤 X-100(in PBS)로 20분 동안 실온에서 투과화(permeabilization)하였다. 비-특이적 단백질을 감소시키기 위해, 우혈청 알부민(BSA, Sigma-Aldrich, MO, USA)으로 4시간 동안 실온에서 신경구를 블로킹하였다. 블로킹한 신경구를 항-뉴런 클래스 III β -튜불린(Tuj1, Stem cell technology, Canada) 항체로 4°C에서 밤새 항온반응 시켰다. 신경구를 PBS로 3회 세척하고 Alexa Flour 488 2차 항체로 4°C에서 4시간 동안 항온반응 시켰다. 다음, 세포 핵을 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Invitrogen, CA, USA)로 대비염색하였다. 공초점 레이저 현미경(LSM 710, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 형광을 관찰하였다.

[0086] 결과

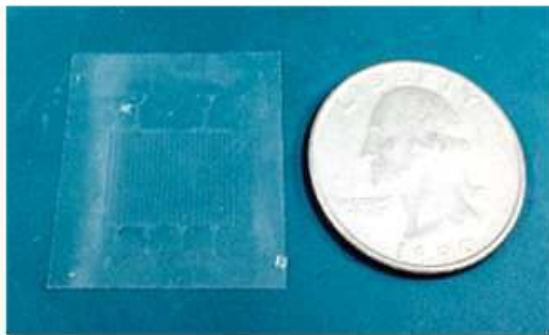
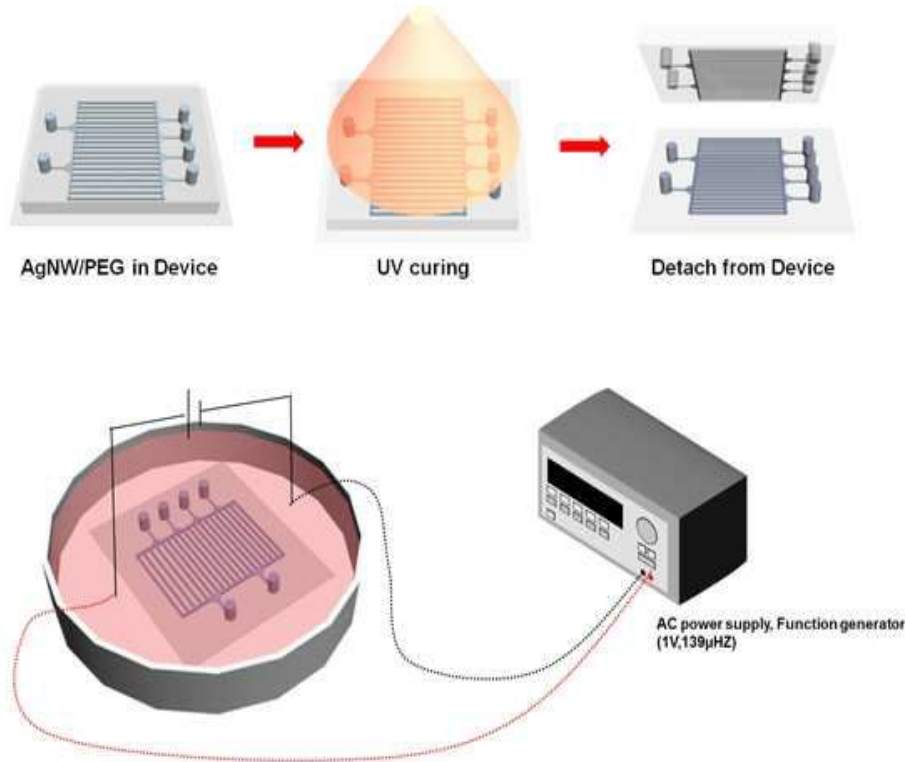
[0087] 실험결과 150, 300 μm 의 직경을 갖는 디바이스는 보다 200 μm 의 직경을 갖는 디바이스에서 신경세포로 분화가 더 잘 발생하는 것을 확인하였고, 1V, 5V 및 15 V보다 10 V의 전기적 자극을 주었을 때 신경세포로 분화가 더 잘 이루어지는 것을 확인하였다. 이는 세포가 분화를 하는데 있어서 공간 및 전기자극의 역할이 중요하다는 사실을 입증하였다. 도 4의 결과는 10V로 전기적인 자극을 가하였을 때 신경줄기세포로의 분화도와 신경돌기의 경향성을 확인한 결과이다. 1 V 및 5 V보다 10 V에서 가장 신경세포로 분화가 잘되었고, 신경돌기 역시

길이와 수에 있어서 가장 잘 발달이 되었다. 또한 컨트롤과 비교하였을 때 패턴이 있는 부분에서 신경돌기가 더욱 길고 방향성이 있게 성장하는 것을 확인할 수 있었다.

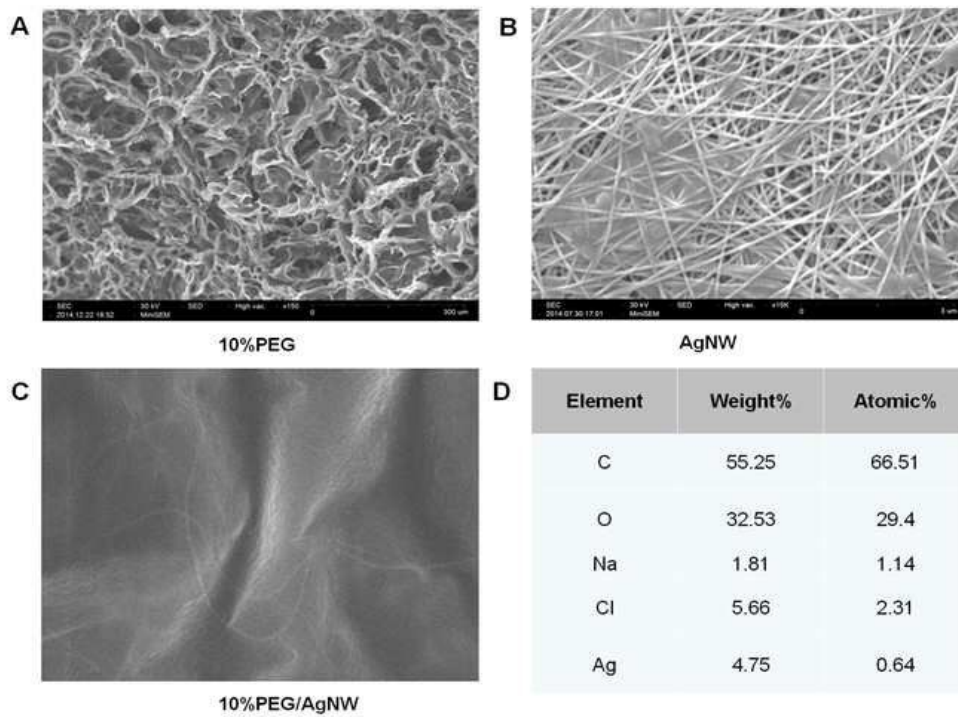
[0089] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

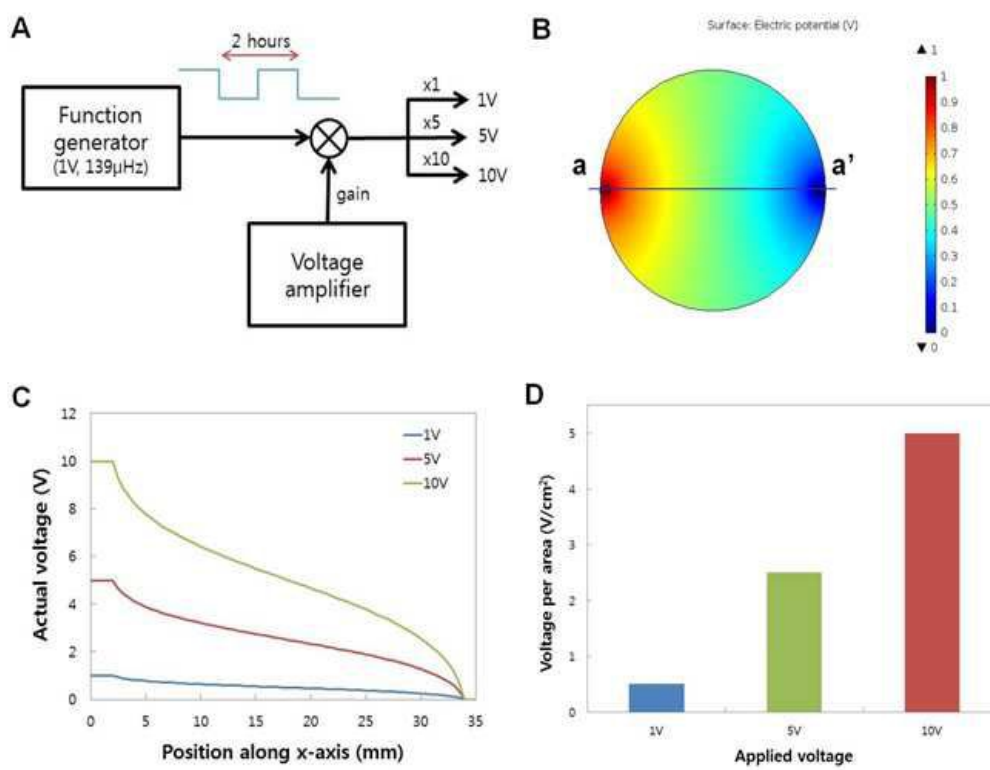
도면1



도면2



도면3



도면4

