

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0140193

(43) 공개일자 2019년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) C12N 13/00 (2017.01)

C12N 5/079 (2010.01) C12N 5/0793 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0679 (2013.01)

C12N 13/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0066676

(22) 출원일자 2018년06월11일

심사청구일자 2018년06월11일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김민석

서울특별시 양천구 안양천로 1071, A동 305호 (목동)

유희정

서울시 양천구 목동서로 234, 102동 506호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

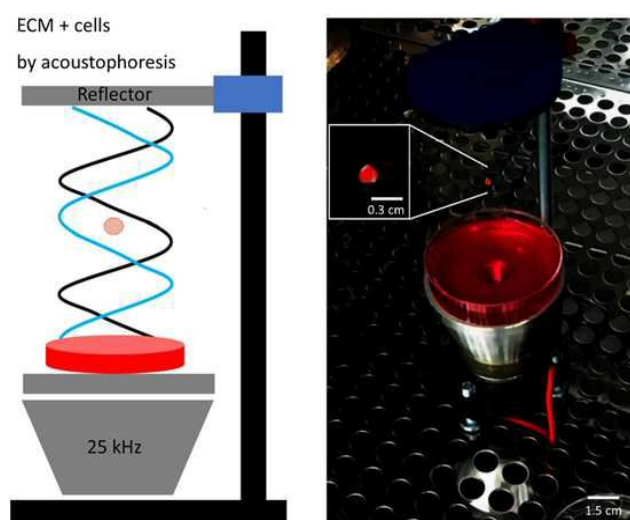
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 공중부양을 이용한 조직 생성 방법

(57) 요약

본 발명은 세포외기질에 세포를 시딩하는 단계 및 상기 세포가 시딩된 세포외기질을 공중부양하여 배양하는 단계를 포함하는 조직 생성 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조직 생성 방법은 적은 수의 세포만으로도 효과적인 조직 생성이 가능하고, 생성된 조직은 이식시 정상적인 조직과 유사한 기능을 수행하며, 독성을 전혀 나타내지 않아 안전하고 효과가 우수한 조직 이식체로 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0619 (2013.01)

C12N 5/0622 (2013.01)

C12N 5/069 (2013.01)

C12N 5/0691 (2013.01)

C12N 5/0697 (2013.01)

(72) 발명자

김혜윤

서울특별시 양천구 목동중앙로 11, A202동 1206호
(목동, 대원칸타빌2단지아파트)

유주연

경기도 동두천시 봉동로 40번길 46-27, 103동 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027945

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초의과학분야지원사업

연구과제명 조직손상방어연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

세포외기질에 세포를 시딩(seeding)하는 단계; 및

상기 세포가 시딩된 세포외기질을 공중부양하여 배양하는 단계를 포함하는, 조직 생성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포외기질은 장의 세포외기질인 것인, 조직 생성 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포는 장의 신경 세포, 신경교세포, 상피 세포, 혈관 내피 세포 및 평활근 세포를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 조직 생성 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조직은 연조직 또는 세포외기질이 얇은 조직의 생성 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조직은 장의 조직인 것인, 조직 생성 방법.

청구항 6

제1항의 방법으로 형성한 조직 단위체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조직은 장 조직인 것인, 조직 단위체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조직 단위체는 장 운동성 및 장근전도 (electrogastrogram, EGG)가 향상된 것인, 조직 단위체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포외기질에 세포를 시딩(seeding)하는 단계 및 세포가 시딩된 세포외기질을 공중부양하여 배양하는 단계를 포함하는 조직 생성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직, 구체적으로 인체조직은 사고나 선천적 질환에 의한 장애와 질병으로 고통받는 환자들에게 신체기능 회복, 질병 치료 등을 위하여 이식되는 피부, 인대 등의 인체의 일부를 의미한다(인체조직 기증·이식 적합성 평가 가이드라인, 2017.1). 사회가 산업화되고 발전함에 따라 산업재해가 증가하면서 이에 따른 장애와 질병을 치료하기 위한 이식의 수요가 지속적으로 증가하고 있다.

[0003] 일반적으로, 조직 이식은 그 형태가 온전히 유지되는 장기나 조직 등을 타인으로부터 기증받아 실시하였다. 그러나, 타인으로부터 기증받은 조직은 수혜자에 이식을 하더라도 면역반응 등이 일어나지 않는지 여부 등의 적합성 평가가 반드시 필요하다. 또한, 적합하다고 판정되더라도 기증자의 의학적, 사회적 이력에 따라 이식에 위험성이 따르거나, 이식 자체가 불가능할 수 있어 실제 이식으로 이루어지기 까지 수많은 장벽이 존재하는 문제점이 있었다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하기 위하여 수혜자 자신으로부터 분리하여 생성한 조직을 사용하여 이식하는 방법이 연구되고 있다. 구체적으로, 외과적 절제술이 필요한 크론병과 궤양성 장염과 같은 장 관련 질병의 치료 방법 중 하나로 생성된 장 조직의 이식이 사용되고 있다. 이를 위해, 세포외기질(extra cellular matrix, ECM)과 줄기세포를 이용하여 장 재생을 향상시키기 위한 노력이 계속되고 있다. 그러나, 세포외기질이 얇은 조직인 경우, 대부분의 공급된 줄기세포가 세포외기질에 부착되지 않아서 상당히 많은 수의 세포를 사용해야하는 비효율적인 문제가 있었다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 세포외기질이 얇은 조직을 효율적으로 생성하기 위한 연구를 수행한 결과, 음향 공중부양을 이용하는 경우 조직의 생성이 효율적일 뿐만 아니라, 생성된 조직이 정상적인 조직의 기능을 수행함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 인체조직 기증·이식 적합성 평가 가이드라인, 2017.1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 세포외기질에 세포가 잘 부착될 수 있도록 공중부양하여 배양하는 단계를 포함하는 조직 생성 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 세포외기질에 세포를 시딩(seeding)하는 단계 및 세포가 시딩된 세포외기질을 공중부양하여 배양하는 단계를 포함하는, 조직 생성 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 조직 생성 방법은 기존에 일반적으로 사용되는 조직 생성 방법과 비교하여, 적은 수의 세포를 시딩하더라도 정상적인 기능을 수행하는 조직을 효과적으로 생성할 수 있다.

[0010] 조직을 생성하기 위한 방법으로, 본 발명은 세포외기질에 세포를 시딩하는 단계를 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서 생성되는 조직은 연조직 또는 세포외기질이 얇은 조직이다. 본 발명에서 사용되는 용어, “연조직”은 인체의 구성요소인 뼈, 굵은 신경, 큰 맥관 등을 제외한 다른 부분으로 근육, 피하조직, 피부 및 지방과 그 부속물을 의미한다.

[0012] 세포외기질이 두꺼운 조직과 달리, 세포외기질이 얇은 상태에서는 조직으로 성장시키기에 어려움이 있는바, 본 발명의 조직 생성 방법을 사용할 경우 효과적으로 조직의 생성이 가능하다. 구체적으로, 상기 조직은 장의 조직일 수 있다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 용어, “세포외기질”은 세포를 제외한 조직으로 주로 동물의 구조적 지지 역할 등을 담당한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 연조직 또는 세포외기질이 얇은 조직, 구체적으로 장의 조직을 생성하기 위한 방법으로서, 상기 세포외기질은 장의 세포외기질일 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 연조직 또는 세포외기질이 얇은 조직, 구체적으로 장의 조직을 생성하기 위한 방법에 사용되는 상기 세포는 신경 세포, 신경교세포, 상피 세포, 혈관 내피 세포 및 평활근 세포를 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어, “시딩(seeding)”은 세포외기질에 세포를 혼입하는 것을 의미한다. 일반적으로 시딩은 배지에 미생물을 혼입하는 것을 의미하나, 본 발명은 세포외기질에 세포를 부착시켜 생성된 조직을 제공하는 특성상, 일반적으로 사용되는 의미의 시딩에서 배지와 미생물을 각각 세포외기질과 세포로 치환하여 그 의미를 해석할 수 있다.

[0017] 또한, 조직을 생성하기 위한 방법으로, 본 발명은 상기 단계에 이어서 세포가 시딩된 세포외기질을 공중부양하

여 배양하는 단계를 제공한다.

- [0018] 본 발명에 있어서 사용되는 용어, “공중부양(levitation)”은 중력에 대항하여 안정된 위치 내에 물리적인 접촉점 없이 공중에 떠있는 현상을 의미한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 공중부양은 음향 공중부양일 수 있다. 상기 음향 공중부양에 사용되는 공중부양기는 시중에서 판매되는 음향 공중부양기를 사용할 수 있다. 또한, 음파를 발생시키는 기계를 이용하여 세포외기질을 공중부양시킬 수 있도록 제작한 음향 공중부양기를 사용할 수도 있다. 음향 공중부양에 사용되는 음향 복사의 힘은 10 내지 80 kHz 일 수 있고, 보다 구체적으로 25 kHz일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 음향 공중부양기에서 음파를 발생시키는 거치대는 평면일 수도 있고, 곡선 모양일 수도 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에서, 25 kHz의 음파가 발생하도록 작동하는 음향 공중부양기에 상기 세포가 시딩된 세포외기질을 음파에 위치하면 세포외기질이 공중에 부양함과 동시에 세포외기질 내에 시딩된 세포들은 음파의 영향으로 움직이지 않고 고정되는 효과를 나타내어 상기 세포가 세포외기질에 부착되고 조직으로 성장할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 음향 공중부양하여 배양하는 단계로 생성한 조직은 음향 공중부양없이 배양하여 생성한 조직에 비해서 조직화된 세포의 비율이 현저히 증가하여 정상적인 조직이 생성될 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서 사용되는 용어, “배양”은 생물체 또는 생물체의 일부(특히, 기관, 조직 세포 등)를 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명이 세포외기질에 세포를 시딩하여 생성된 정상적인 조직을 제공하는 특성상, 본 발명에서 상기 배양은 세포외기질에 시딩된 세포가 세포외기질에 부착하는 것뿐만 아니라, 부착 후 성장 및 증식하여 정상적인 조직을 생성하는 것을 모두 포함하는 개념이다.
- [0023] 본 발명은 상기 조직 생성 방법으로 형성한 조직 단위체를 제공한다. 상기 조직 단위체는 세포외기질이 얇은 조직의 단위체일 수 있으며, 구체적으로 장 조직의 조직 단위체일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조직 생성 방법으로 형성한 조직 단위체는 적절한 부위에 이식시 본래의 정상적인 조직과 동등한 수준의 기능을 수행할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 조직 생성 방법, 구체적으로 음향 공중부양하여 배양하는 단계를 포함하는 방법으로 형성한 장 조직의 단위체는 음향 공중부양없이 배양하여 생성한 조직의 단위체와 비교하여, 장에 이식하는 경우 내장 운동성이 증가하고 장근전도가 증가하여 정상적인 조직의 기능의 수행이 가능하다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명의 조직 생성 방법은 적은 수의 세포만으로도 효과적인 조직 생성이 가능하고, 생성된 조직은 이식시 정상적인 조직과 유사한 기능을 수행하며, 독성을 전혀 나타내지 않아 안전하고 효과가 우수한 조직 이식체로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 음향 공중부양을 통해 세포를 부양하여 배양하는 모습을 나타낸 개략도(왼쪽) 및 사진(오른쪽)이다.
- 도 2는 마우스의 대동맥(aorta)과 하대 정맥(inferior vena cava)을 각각 인공 장의 간문맥(portal vein)과 장간막 동맥(mesenteric artery)으로 봉합한 도이다.
- 도 3은 인공 장을 공장에 연결 및 이식한 뒤 장루(stoma)에 봉합한 도이다.
- 도 4A는 Triton-X 100을 처리한 결과 소장외의 탈세포화가 이루어졌고, 음향 공중부양 없이 재조직화한 경우 세포로 재구성된 영역이 거의 없음을 육안으로 확인한 도이고; 도 4B는 Triton-X 100을 처리한 결과 소장외의 탈세포화가 이루어졌고, 음향 공중부양 없이 재조직화한 경우 세포로 재구성된 영역이 거의 없음을 면역 형광법으로 확인한 도이며; 도 4C는 음향 공중부양 없이 재조직화한 경우 세포로 재구성된 영역이 거의 없음을 확인한 그래프이다.
- 도 5A는 음향 공중부양 없이 재조직화한 경우 세포외기질에 부착된 세포가 거의 없음을 면역 형광법으로 확인한 도이고; 도 5B는 음향 공중부양 하에서 재조직화한 경우 세포외기질에 부착된 세포가 현저히 증가하였음을 면역 형광법으로 확인한 도이며; 도 5C는 음향 공중부양 하에서 재조직화한 경우, 그렇지 않은 경우에 비해 세포외기질에 부착된 세포가 현저히 증가하였음을 확인한 그래프이다.
- 도 6은 세포외기질에 사용되는 상피 세포(A), 장신경총의 장내 신경세포 및 신경교세포(B), 및 혈관 내피 세포

및 평활근 세포(C)는 나타내는 도이다.

도 7A와 7B는 상피 세포, 장내 신경세포 및 신경교세포, 및 혈관 내피 세포 및 평활근 세포에서 세포자살, 소포체 스트레스(ER stress) 및 산화 스트레스와 관련된 파라미터를 웨스턴 블랏으로 확인 및 그래프로 분석한 것이고, 음향공중부양에 노출되어도 세포자살, 소포체 스트레스(ER stress) 및 산화 스트레스를 증가시키지 않았음을 나타내는 도이다.

도 8은 음향 공중부양 하에서 제조한 인공 장이 그렇지 않은 인공 장에 비해 마우스에 이식 시 내장 운동성(intestinal motility)이 증가함을 확인한 그래프이다.

도 9는 음향 공중부양 하에서 제조한 인공 장이 그렇지 않은 인공 장에 비해 마우스에 이식 시 장근전도(electrogastrogram, EGG)가 증가함을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] **실시예 1: 마우스 소장의 탈세포화(decellularization) - 장의 세포외기질의 제조**

[0030] 8주령의 C57BL/6 수컷 마우스(찰스 리버, 미국)에 375 mg/kg의 2,2,2-트리브로모에탄올(T48402, 시그마 알드리치, 미국)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후, 장 부분을 절제하였다. 장간막 동맥(mesenteric artery)을 삼관한 후, 장 부분을 0.1% Trixon X-100(10603, 머크, 독일)로 8분간 관류하였다. 탈세포화 한 후, 장의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 10분간 인산 완충 식염수(PBS, 10010023, 인비트로젠, 미국)로 관류시키고, PBS 또는 10% 포르말린(HT5011, 시그마 알드리치, 미국)에서 보관하였다.

[0031] **실시예 2: 장의 신경세포, 신경교세포, 상피세포, 혈관 내피 세포 및 평활근 세포의 분리 및 배양**

[0032] 장의 신경세포와 신경교세포(glia)를 분리하기 위해, 8주령의 C57BL/6 수컷 마우스에 375 mg/kg의 2,2,2-트리브로모에탄올(T48402, 시그마 알드리치, 미국)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후, 소장을 절제하였다. 근육층이 분리될 때까지 면봉을 사용하여 종주근(Longitudinal muscle)을 뽑았다. 분리된 근육 층 내에 존재하는 장신경총(myenteric plexus)을 1.3 mg/ml의 콜라제네이즈 II형(LS004177, 워팅턴, 미국)에서 60분 동안 37 °C, 70% O₂ / 30% CO₂ 에서 보관하였다. 조직에서 세포가 분리된 후, 세포들을 356 × g에서 8분간 원심 분리하였다. 분리된 세포는 B-27 (17504044, 써모피셔, 미국), 2 mM L-glutamine (25030149, 써모피셔, 미국), 1% FBS (10099133, 써모피셔, 미국) 및 10 ng/ml glia-유래 신경영양인자 (CYT-243, ProSpec-Tany TechnoGene, 이스라엘)를 포함하는 neurobasal A 배지 (10888022, 써모피셔, 미국)에서 5일간 배양하였다.

[0033] 상피세포를 분리하기 위해, 소장을 해부하고 EDTA-PBS로 4 °C에서 세척하였다. 세척한 장 조직을 10분 동안 Gentle Cell Dissociation Reagent (07174, Stemcell Technologies, 캐나다)로 격렬히 섞어서 창자움(crypt)을 방출시켰다. 30분 동안 37 °C에서 콜라제네이즈 IV형(LS004188, 워팅턴, 미국)으로 처리 후, 상등액 분획을 70 μm 여과기로 여과하고 100 × g에서 5 분간 원심 분리하였다. 세포 펠렛을 재현탁하고, IntestiCult Organoid Growth Medium (06005, Stemcell Technologies, 캐나다)을 사용하여 matrigel bubble (356230, 코닝사, 미국)에서 배양하였다.

[0034] 혈관 내피 세포 및 평활근 세포를 분리하기 위해, 대동맥을 해부하여 1.3 mg/ml의 콜라제네이즈 I형(LS004197, 워팅턴, 미국) 완충액에서 60분 동안 배양하였다. 소화된 용액을 MACS 컬럼 (130-101-372, Miltenyi Biotec, 미국)으로 통과시켜 섬유아세포(fibroblast)를 제거하였다. 나머지 용액을 DMEM 배지에서 20% FBS로 유지시키고, 내피 세포 및 평활근 세포의 배양에 사용하였다.

[0035] **실시예 3: 음향 공중부양**

[0036] 평면형(plate type) 음향 공중부양기를 Richard Haberkern(음향 부상 기계, 미국)에서 구입하였다. 곡면형 음향 기계를 설계하기 위한 재료를 Makerfabs (제품 코드 : ORK328ALK, 중국)에서 구입하였다. Arduino Nano (A000005, ARDUINO, 이탈리아) 및 150 × 25 kHz 변환기(transducer)를 L298N 듀얼 모터 드라이브 보드(L298N2A, Tronix labs, 호주)에 연결하였다. 상기 기기를 95% O₂ / 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에 설치하였다. 실험시, 상기 실시예 1에서 제조한 장의 세포외기질은 변환기에 의해 생성된 25 kHz 음향 음파에 위치시켜 실험을 수행하였다(도 1).

[0037] **실시예 4: 인공 장의 재조직화(recellularization)**

[0038] 음향 공중부양 없이 상피 세포를 시딩하기 위해, IntestiCult Organoid Growth Medium (06005, Stemcell Technologies, 캐나다)에 현탁된 1×10^4 세포를 상기 실시예 1에서 제조한 장의 세포외기질에 투입하였다.

[0039] 또한, 상기 실시예 3의 음향 공중부양 하에서 장내 신경세포 등을 시딩하기 위해, IntestiCult Organoid Growth Medium (06005, Stemcell Technologies, 캐나다)에 현탁된 1×10^4 세포(장내 신경세포, 신경교세포 및 장의 줄기 세포)를 3 ml씩 관류하여 장의 세포외기질에 투입하였다. 10회 반복 후, 장내 장간막 동맥에 내피 및 평활근 세포를 투입하였다. 재조직화된 장을 95% O₂ / 5% CO₂ 및 37 °C 조건에서 유지하였다.

[0040] **실시예 5: 면역 형광법**

[0041] 장 세포, 조직 세포외기질 또는 재조직화된 인공 조직을 12시간 동안 10% 포르말린에 두었다. 포르말린 고정 및 파라핀의 삽입 후, 실란(silane)이 코팅된 슬라이드 상에서 3mm로 단면을 절단하였다. Alexa Fluor 항체 라벨링 키트를 사용하여 alexa fluor 594(A20185, Life technologies), 350(A20180, Life technologies) 또는 488(A20181, Life technologies)와 항체를 접합시켰다. 상기 슬라이드를 ECAD(1:400; ab15148, Abcam), VILLIN(1:400; ab130751, Abcam), CHGA(1:400; LK2H10, Abcam), MUC2(1:400; ab76774, Abcam), β -III-tubulin(1:400; ab78078, Abcam), GFAP(1:400; ab16997, Abcam) 또는 콜라겐 IV(1:400; ab19808, Abcam)에 대한 항혈청 및 ROS(ab139476; Abcam)의 검출 시약 또는 세포자살 검출 (TUNEL; Abcam)과 함께 45분 동안 항온 배양하였다. PBS로 세척한 다음, 상기 슬라이드에 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) histology mounting medium(F6057, 시그마 알드리치, 미국)을 도포한 뒤, Zeiss LSM 510 공 초점 현미경(Carl Zeiss, German)을 사용하여 시각화 하였다.

[0042] **실시예 6: 웨스턴블랏**

[0043] 분리된 세포를 저온 용해 완충액에서 균질화하였다. 5,000 g에서 20분 동안 원심 분리한 후, Bradford 단백질 분석을 사용하여, 상등액의 단백질 함량을 정량화하였다. 샘플을 희석시키고, 샘플 로딩 염료를 가열하여 SDS-PAGE(4561033EDU, Bio-Rad)에서 사용하였다. 블로팅 후, 0.1 % Tween-20(P1379, 시그마 알드리치)을 함유하는 PBS 중의 5 % 탈지유(70166, 시그마 알드리치)에서 막(membrane)을 블로킹시켰다. 상기 막을 P-elf2a(1:1000, # 3398, Cell signaling), elf2a(1:1000, # 9722, Cell signaling), CHOP(1:1000, # 5554, Cell signaling), Grp78(1:1000, ab16687, Abcam), Lgr5(1:1000, ab75732, Abcam), β -III-tubulin(1:1000, ab78078, Abcam), GFAP(1:1000, ab16997, Abcam), RECA-1(1:1000, ab9774, Abcam), SM actin(1:1000, ab5694, Abcam) 및 β -actin(1:1000, mAbcam 8226, Abcam)에 대한 항혈청을 처리한 다음, 2차 항체(마우스 특이적 HRP 접합 항체 또는 토끼 특이적 HRP 접합 항체)를 처리하였다. ECL (32106, Thermo Scientific) 검출 키트를 사용하여 밴드를 시각화하고 정량화하였다.

[0044] **실시예 7: 마우스에 인공 장의 이식**

[0045] 10주령의 C57BL/6 수컷 마우스에 장의 이식을 수행하였다. 구체적으로, 이소플루란으로 마취시킨 상기 마우스의 복부 대동맥(abdominal aorta)과 하대 정맥(inferior vena cava)을 노출시킨 다음 관찰시켰다. 상기 실시예 4에서 제조한 인공 장을 혈관에 연결하기 위해, 대동맥과 하대 정맥을 분리 후 인공 장의 장간막 동맥과 문맥으로 각각 봉합하였다(도 2). 이 후, 관찰을 풀어 혈액 순환을 열었고, 인공 장을 소장과 연결하였다. 이 후, 클램프를 제거하여 장관을 연결한 후, 장루(stoma)와 인공 장을 봉합하였다(도 3). 마우스에 40 mg/kg의 cefuroxime을 투여하고 복강을 봉합하였다.

[0046] **실시예 8: 인공 장의 운동성 및 장근전도**

[0047] 산소가 공급된(95% O₂ / 5% CO₂) Krebs 완충액(K4002, 시그마 알드리치, 미국)의 버킷에 인공 장을 넣었다. 고립된 부분의 운동 패턴과 장근전도(electrogastrogram, EGG)는 Biopac 증폭기(MP150, Biopac system, 미국)에 연결된 개별적 힘 계측기를 사용하여 기록하였다. 힘 계측기(SS121A, Biopac system, 미국)와 프로브(ECG100, Biopac system, 미국)를 장막에 부착하였다. 수축성 및 전자 신호는 AcqKnowledge software(3.9.1, Biopac system, 미국)로 디지털화 하고 분석하였다.

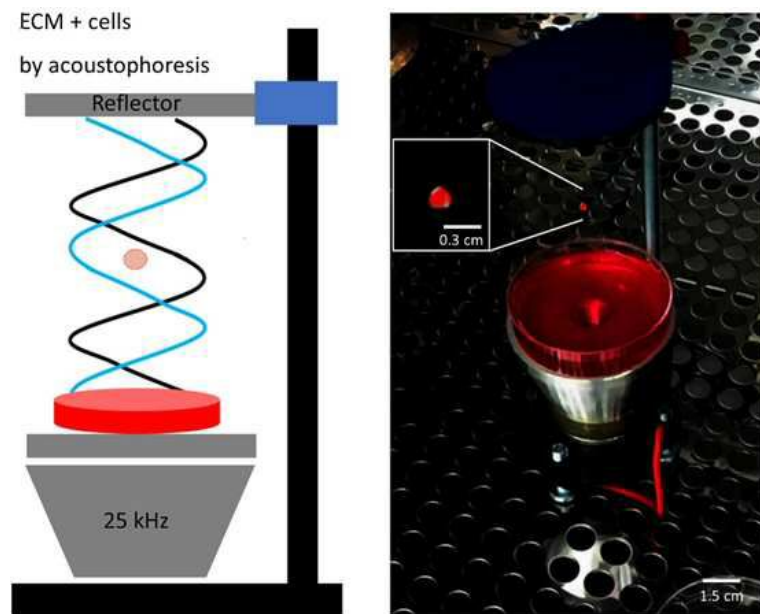
[0048] **실험결과**

[0049] **1. 소장의 탈세포화 및 음향 공중부양 없이 장 조직 재생성**

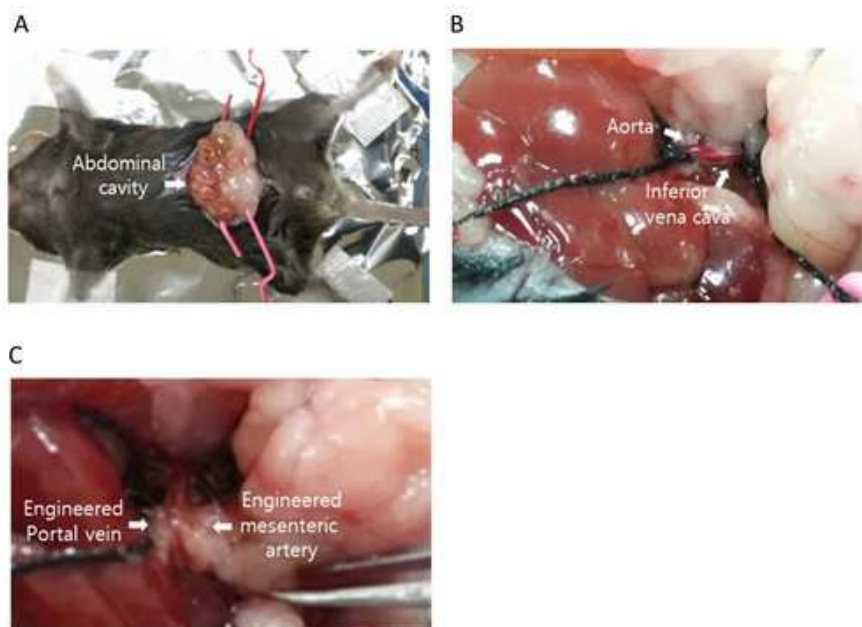
- [0050] 상기 실시예 1에 따라 마우스의 소장을 탈세포화 한 결과, 탈 세포화된 분획에서 세포의 핵이 완전히 제거되었음을 확인하였다. 또한, 장의 조직을 재생성 하기 위하여, 상기 실시예 4 중에서 음향 공중부양 없이 장을 조직화 한 결과, 오직 8%의 세포외기질의 영역만이 세포로 재구성되었고, 나머지 세포는 세포 배양액으로 방출되었음을 확인하였다(도 4).
- [0051] 이를 통해, 소장의 세포외기질에 세포를 시딩 하더라도, 세포가 제대로 정착되지 않아 세포외기질이 조직으로 재구성되지 않음을 알 수 있다.
- [0052] **2. 조직의 재생성에서 음향 공중부양의 역할**
- [0053] 상기 실시예 4와 같이, 음향 공중부양 없이 재조직화한 세포외기질과 음향 공중부양 하에서 조직화한 세포외기질에 부착된 세포수를 비교하였다.
- [0054] 구체적으로, 상피 세포를 세포외기질의 부분(약 0.2 cm 직경)에 시딩한 후, 25 kHz의 음파가 작동중인 음향 공중부양 장치에 상기 세포외기질을 위치시켜 30분 동안 조직화하였다. 그 결과, 공중 부양없이 일반적인 방법으로 배양한 경우 실험 전 세포외기질과 비교하여 부착된 세포수가 거의 존재하지 않음을 확인하였다. 반면, 공중 부양하에서 배양한 경우, 실험 전 세포외기질과 비교하여 부착된 세포수가 현저히 증가하였으며, 구체적으로 공중 부양없이 배양한 경우에 비해 재조직화된 세포가 5배 증가하였음을 확인하였다(도 5).
- [0055] **3. 음향 공중부양의 세포독성**
- [0056] 재조직화시 부착능을 향상시키는 음향 공중부양이 세포에 독성을 나타내는지 여부를 확인하였다.
- [0057] 구체적으로, 25 kHz의 음파에 노출된 상피 세포, 장신경총(myenteric plexus)의 장의 신경세포 및 신경교세포, 혈관 내피 세포 및 평활근 세포에서 세포자멸(apoptosis), 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 스트레스 및 산화 스트레스(oxidative stress)와 관련된 파라미터를 측정하였다(도 6). 측정 결과, 상기 세포들이 음향 공중부양에 노출되어도 세포자살, ER 스트레스, 산화 스트레스와 관련된 마커가 전혀 증가하지 않음을 확인하였다(도 7).
- [0058] **4. 음향 공중부양시 장 운동성 및 장근전도 개선**
- [0059] 상기 실시예 7과 같이 마우스에 인공 장을 이식하여 4주 경과한 뒤, 상기 실시예 8과 같이 이식된 장의 운동성 및 장근전도를 평가하였다. 평가 결과, 음향 공중부양 없이 제조한 장은 내장 운동성과 장 근전도가 미미 하였으나, 음향 공중 부양 하에서 제조한 인공장의 경우 본래의 장에 비해 25%의 내장 운동성과 50%의 장근전도를 나타냄을 확인하였다 (도 8 및 도 9).
- [0060] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

도면

도면1



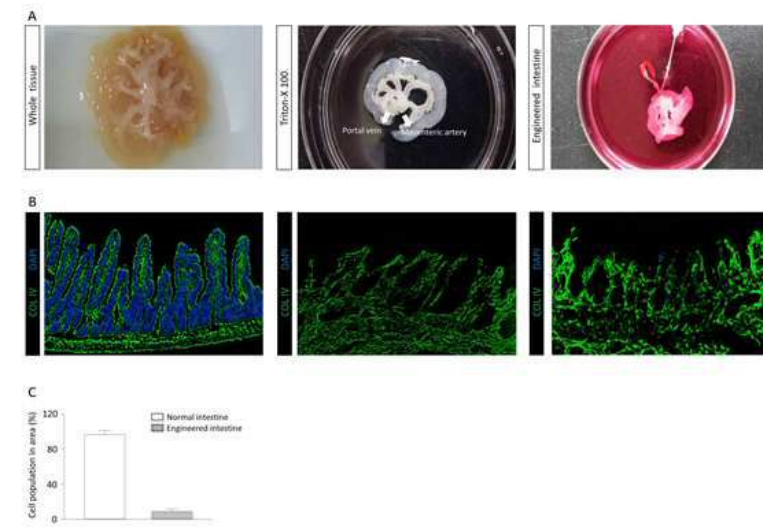
도면2



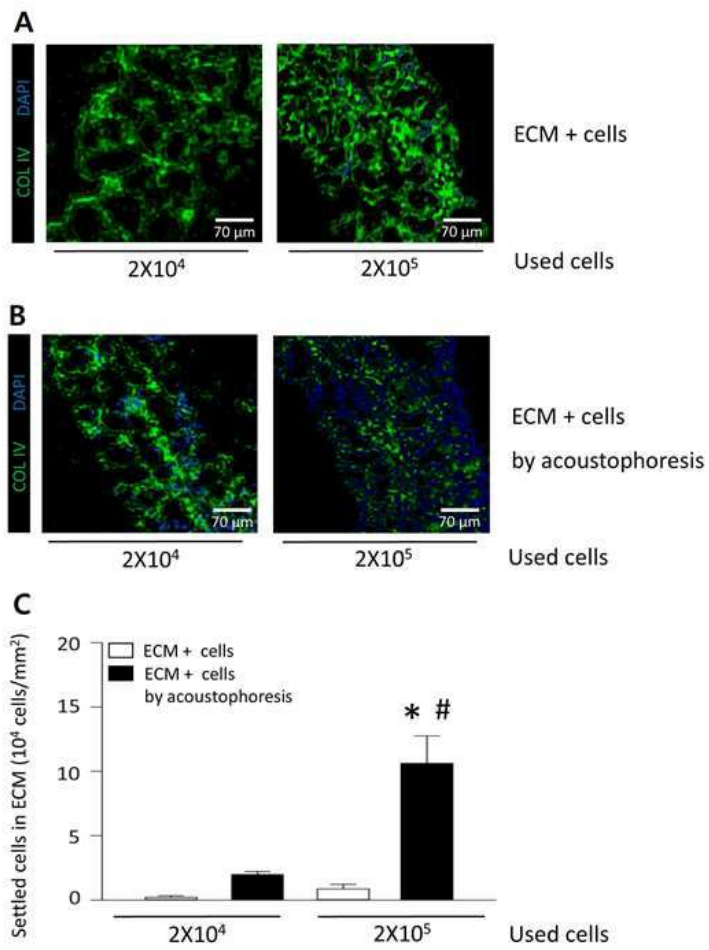
도면3



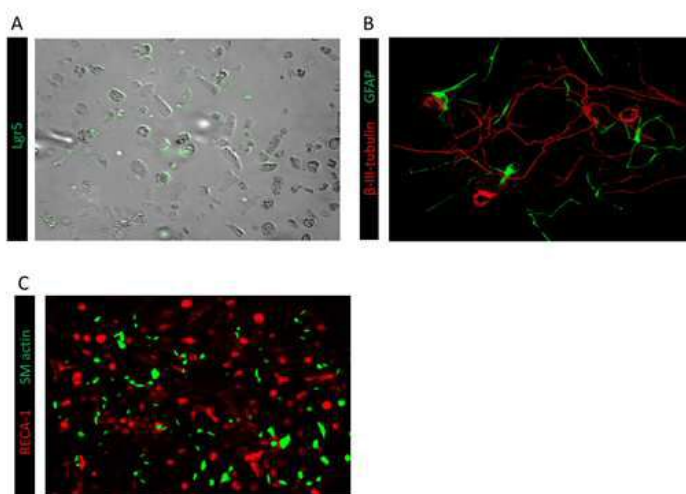
도면4



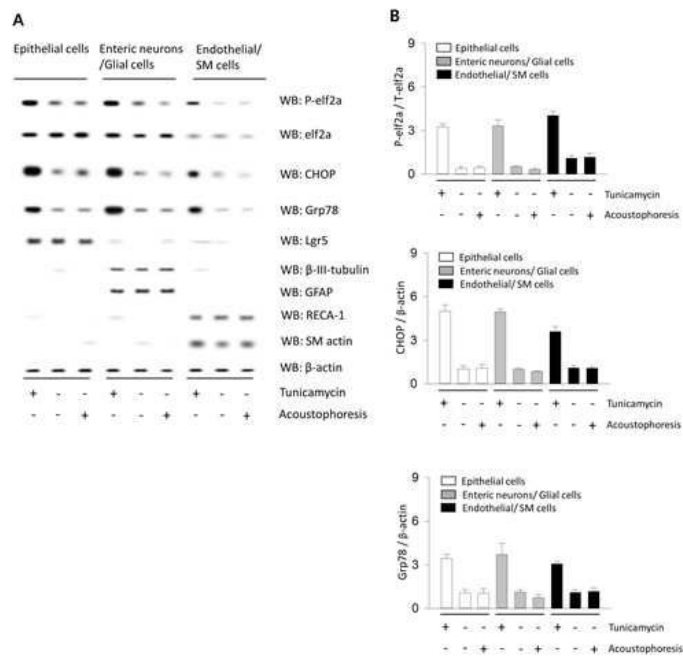
도면5



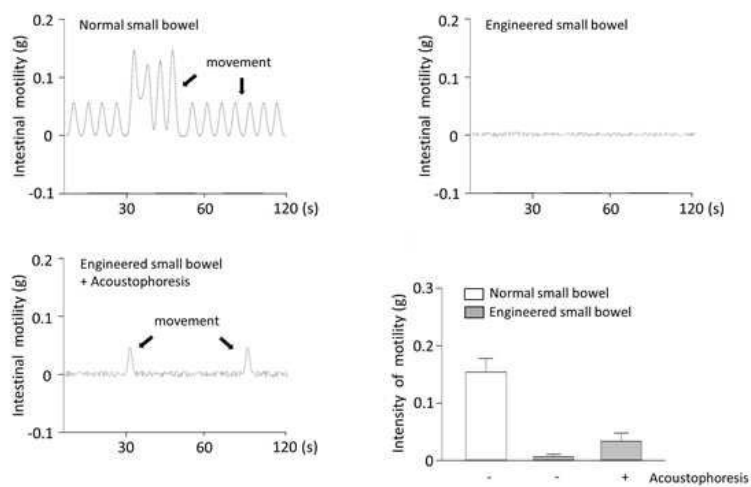
도면6



도면7



도면8



도면9

