(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0132588
(43) 공개일자 2021년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0619 (2013.01)
C12N 2501/998 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0018703
(22) 출원일자 2021년02월09일
심사청구일자 2021년02월09일
(30) 우선권주장
1020200051037 2020년04월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김대성
서울특별시 성동구 금호로 173, 104동 606호 (금호동2가, 신금호파크자이)
연규범
경기도 성남시 분당구 미금로 177, 308동 702호 (구미동, 까치마을신원아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

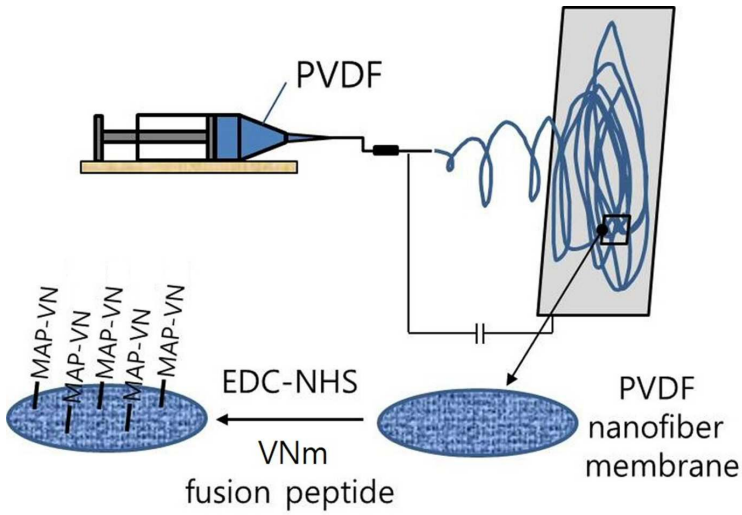
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **줄기세포 배양용 배양 지지체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체에 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드가 결합된 줄기세포 배양용 지지체, 이를 이용한 줄기세포 장기 유지 배양 방법 및 심근세포 분화 방법에 관한 것으로, 상기 줄기세포 배양용 지지체는 생체적합성 물질로 이루어져 안전하며, 줄기세포 배양용 지지체를 사용하면 줄기세포의 전분화능을 유지하면서 10계대 이상 장기간 배양할 수 있고, 줄기세포로부터 심근세포를 효율적으로 분화시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2506/02 (2013.01)
C12N 2533/30 (2013.01)
C12N 2533/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711081593
과제번호 2017M3A9F8032402
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 생리활성물질 및 세포외기질 고정화를 통한 전분화능 줄기세포의 고효율 유지 배양 및 분화용배양기 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.01 ~ 2020.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체; 및

(ii) 상기 나노섬유에 결합된 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드;를 포함하는, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유는 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리톨산(PGA), 폴리[(락틱-co-글리콜산)](PLGA), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)](PHBV) 및 폴리비닐알코올(PVA)로 이루어진 군에서 선택되는 물질로 이루어진, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유는 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF)로 이루어진, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유는 직경이 100 내지 1000 ㎚인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체는 두께가 1 내지 10 ㎛인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체는 기공 크기가 0.2 내지 2.0 ㎛인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 비트로넥틴 유래 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 홍합 접착 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 융합 펩타이드는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 전분화능 줄기세포인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 역분화 줄기세포인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 줄기세포 배양용 지지체는 줄기세포의 제노프리(xenofree) 배양에 사용되는, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 13

제1항의 줄기세포 배양용 지지체에서 줄기세포를 배양하는 단계;를 포함하는, 줄기세포의 장기 유지 배양 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 줄기세포의 장기 유지 배양 방법은 줄기세포를 10계대 이상 배양하는 것인, 줄기세포의 장기 유지 배양 방법.

청구항 15

(a) 제1항의 줄기세포 배양용 지지체에서 줄기세포를 배양하는 단계; 및

(b) 배양된 줄기세포를 줄기세포 배양용 지지체 상에서 심근세포로 분화를 유도하는 단계;를 포함하는, 줄기세포로부터 심근세포를 분화시키는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (b)는 줄기세포를 심근세포 분화 유도 배지에서 배양하는 것인, 줄기세포로부터 심근세포를 분화시키는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 줄기세포 배양용 지지체는 직경이 500 내지 900 ㎚인 나노섬유로 이루어진, 줄기세포로부터 심근세포를 분화시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체에 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드가 결합된 줄기세포 배양용 지지체, 이를 이용한 줄기세포 장기 유지 배양 방법 및 심근세포 분화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인간 배아 줄기세포(human embryonic stem cell, hESC)는 무한한 증식 능력과 폭넓은 분화 잠재력으로 인해 다양한 생물 의학 응용 분야에서 매우 귀중한 자원이다. 인간 배아 줄기세포의 응용을 위한 전제 조건 중 하나는 이종성분 불포함(xenofree) 조건에서 대량으로 세포를 증식시킬 수 있고, 필요시 특정세포로의 분화가 가능한 세포 배양 플랫폼의 존재 여부이다. 현재까지 몇몇 합성 또는 천연 폴리머, 세포외 기질에서 분리된 성분 등을 사용하여 인간 배아 줄기세포의 증식 배양에 적합한 기질을 제조했으며, 그 중 일부는 상용화되어 실험실과 산업에서 사용되기 시작하였다(비특허문헌 1). 이들은 대부분 기존 배양 플레이트 바닥을 코팅하여 2차원적(2D)인 세포 배양을 하기 위한 재료로 활용되고 있다. 최근 세포가 3차원적(3D)인 공간에서 섬유상 기저막(fibrous basement membrane)에 부착하여 생장한다는 사실에 기반하여 하이드로젤(hydrogel)과 같은 다양한 3차원적인 배양 플랫폼들이 제안되었지만 (비특허문헌 2) 아직 실험실에서 개념 증명 수준에 머무르고 있다. 아울러 아직까지 증식 배양 및 분화 유도에 동시에 활용가능한 지지체는 개발이 미비한 상황이다.

[0004] 줄기세포는 세포외 기질과 같은 주변 미세환경(niche)의 물리화학적, 생화학적 특성에 따라 민감하게 반응하여 전분화능 유지 및 분화 능력을 변화시키게 된다.

[0005] 따라서 줄기세포의 특성에는 영향을 미치지 않으면서 3차원 및 이종성분 불포함 조건에서 줄기세포를 배양할 수 있고, 동시에 특정세포로의 분화 유도에 사용될 수 있는 새로운 배양 지지체의 개발은 인간 배아줄기세포의 응

용에 필요한 기술이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Celiz et al., (2014). Materials for stem cell factories of the future. Nature Materials, 13, 570-579.

(비특허문헌 0002) 2. Thomas Richardson et al., (2020). Engineered peptide modified hydrogel platform for propagation of human pluripotent stem cells. Acta Biomater, 113:228-239.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 생체내 섬유상 기저막과 유사한 물리화학적 구조를 제공하는 지지체를 제작하고자 하였다. 이를 위해 줄기세포 배양에 적합한 소재(생체적합성 소재)로 나노섬유를 제작하고 적절한 직경 및 기공 크기 등을 조사하였다. 또한 세포 부착과 생장을 극대화할 수 있는 세포외 기질 성분을 발굴, 나노섬유에 접목하여 줄기세포 배양에 최적화된 지지체를 제작하고자 노력하였다. 그 결과, PVDF 나노섬유를 전기방사하여 지지체를 제조하고, 지지체에 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드(VNm)를 결합시키면 인간 배아 줄기세포의 부착 및 생장이 용이하고 10계대 이상의 장기 유지 배양이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 일 목적은 상기 구조를 갖는 인간 배아 줄기세포 배양용 지지체를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명자들은 상기 지지체를 사용하면 인간 배아 줄기세포로부터 심근세포로의 분화 효율이 증진되는 것을 확인하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 다른 목적은 상기 줄기세포 배양용 지지체를 이용한 심근세포 분화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은

[0014] (i) 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체; 및

[0015] (ii) 상기 나노섬유에 결합된 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드;를 포함하는, 줄기세포 배양용 지지체를 제공한다.

[0016] 본 발명에서, "지지체(scaffold)"란 세포를 부착시켜 배양하기 위한 구조체를 말하며, 세포외 기질(extracellular matrix, ECM) 역할을 하여 세포가 생장할 수 있는 환경을 제공한다.

[0017] 본 발명에서, 상기 지지체는 생체적합성 나노섬유로 이루어지며, 생체적합성 나노섬유를 전기방사하여 제조하는 방법 또는 당업계에 알려진 다른 방법으로 제조될 수 있다. 전기방사 방법은 나노섬유의 직경을 자유롭게 조절할 수 있고, 나노섬유 사이에 기공이 형성되어 나노섬유 코팅이 용이한 장점이 있다.

[0018] 본 발명에서, "생체적합성 나노섬유"란 생체적합성 물질로 제조된 나노섬유를 말하며, 생체적합성 물질은 생체조직 또는 혈액과 접촉하여 조직을 파괴시키거나 혈액을 응고시키지 않는 조직적합성(tissue compatibility) 및 항응혈성(blood compatibility)을 갖는 물질을 말한다.

[0019] 본 발명에서, 상기 생체적합성 물질은 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리톨산(PGA), 폴리[(락틱-co-글리콜산)](PLGA), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)](PHBV) 및 폴리비닐알코올(PVA)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 PVDF 일 수 있다.

[0020] 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride, PVDF)는 정교한 마이크로패턴 또는 나노섬유를 제조하기 위해 쉽게 가공할 수 있는 물질로 세포 배양 연구 및 조직 공학에 사용될 수 있다. 또한, 장기적인 안정성과 생체적합성으로 인해 단일필라멘트 혈관 봉합사와 같이 의학 분야에서 수십 년 동안 사용되어 왔다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 생체적합성 물질인 PVDF 용액을 전기방사하여 PVDF 나노섬유로 이루어진 지지체를 제조하였으며, PVDF 나노섬유가 비교적 균일한 직경을 갖고, 나노섬유 사이에는 기공이 형성되어 지지체로서 적합한 형태를 갖는 것을 확인하였다(도 3).

[0022] 본 발명에서, 상기 생체적합성 나노섬유는 직경이 100 내지 1000 ㎚일 수 있으며, 바람직하게는 100 내지 800 ㎚, 더욱 바람직하게는 150 내지 800 ㎚일 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에서 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체는 두께가 1 내지 10 ㎛일 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 8 ㎛, 더욱 바람직하게는 2 내지 6 ㎛일 수 있다.

[0024] 본 발명에서 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체는 나노섬유 사이에 기공이 존재한다. 이 기공은 크기가 0.2 내지 2.0 ㎛일 수 있으며, 바람직하게는 0.2 내지 1.8 ㎛, 더욱 바람직하게는 0.3 내지 1.7 ㎛일 수 있다.

[0025] PVDF 지지체는 소수성 특성으로 인해 줄기세포 부착이 제한적인 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 줄기세포 부착 정도를 개선하기 위해 PVDF 지지체에 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드(VNm)를 결합시켜 줄기세포 배양용 지지체를 제조하였다.

[0026] 홍합 접착 단백질(mussel adhesive protein, MAP)은 홍합이 파도와 부력을 이겨내고 바위 위에 붙어 있을 수 있도록 돕는 단백질이며, 현재까지 홍합 접착 단백질에서 3종의 콜라겐 단백질과 6종의 fp(족사 단백질, Foot protein)가 발견되었다. 홍합 단백질 접착제의 주된 연구 대상은 최초로 발견된 족사 단백질인 fp-1으로 습한 환경에서의 홍합 접착에 주요 역할을 한다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에서, 홍합 접착 단백질은 서열번호 4로 표시되는 MAP 펩타이드, 비트로넥틴에서 유래한 펩타이드는 서열번호 1 (KGGPQVTRGDVFTMP)로 표시되는 아미노산 서열을 사용하였다. 상기 MAP 펩타이드는 서열번호 3으로 표시되는 fp-5 펩타이드의 양 말단에 서열번호 2(AKPSYPPTYK)로 표시되는 fp-1 펩타이드가 6번 반복되는 구조이다 (표 1). 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 홍합 접착 단백질(MAP 펩타이드)과 비트로넥틴 유래 펩타이드 (서열번호 1)의 연결은 당업계에 알려진 펩타이드 결합 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 서열번호 4와 서열번호 1의 아미노산 서열을 펩타이드 결합, 화학적 결합 등으로 연결시킬 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 MAP 펩타이드 (서열번호 4)의 C-말단에 비트로넥틴 유래 펩타이드(서열번호 1)가 연결된 융합 펩타이드를 코딩하는 서열을 플라스미드에 도입하고, 이 플라스미드를 대장균에서 발현시켜 융합 펩타이드(VNm)를 수득하였다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 융합 펩타이드(VNm)는 화학 가교를 통해 PVDF 지지체에 결합될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 PVDF 지지체에 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC) 및 N-hydroxysuccinimide (NHS)를 처리하여 펩타이드와 결합할 수 있는 작용기를 생성시키고, 이후 융합 펩타이드와 반응시켜 PVDF 지지체에 융합 펩타이드가 결합된 VNm-PVDF 지지체를 제조하였다. PVDF 지지체에 결합되는 융합 펩타이드의 양은 PVDF 지지체와 융합 펩타이드를 반응시킬 때 융합 펩타이드의 농도, 반응 시간을 변화시킴으로써 조절할 수 있다.

[0031] 본 발명자들은 상기 VNm-PVDF 지지체를 적용한 플레이트에서 인간 배아 줄기세포를 무피더세포(feeder-free) 배지로 배양한 결과, 다른 기질을 적용한 플레이트에서 배양한 세포와 줄기세포의 형태가 유사한 것을 확인하였다(도 5).

[0032] 따라서, 본 발명의 줄기세포 배양용 지지체는 줄기세포의 제노프리(xenofree, 이종성분 불포함) 배양에 사용될 수 있다. 줄기세포의 제노프리(xenofree) 배양이란 마우스 섬유 모세포에서 유래한 피더세포(feeder cell)와 같이 다른 종의 세포나 성분이 확실하지 않은 물질을 사용하지 않고 줄기세포를 배양하는 것을 말한다. 전분화성 줄기세포의 배양에는 마우스 유래 피더세포를 사용하는 것이 일반적이나 본 발명의 줄기세포 배양용 지지체를 사용하면 마우스 유래 피더세포가 불필요하다.

[0033] 본 발명에서, 상기 줄기세포 배양용 지지체는 세포 배양 플레이트의 바닥에 놓인 상태로 사용될 수 있으나 이에

제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 다른 양상은 상기 줄기세포 배양용 지지체에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 장기 유지 배양 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 전분화능 줄기세포일 수 있고, 상기 전분화능 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 역분화 줄기세포일 수 있으며, 배아 줄기세포, 구체적으로 인간 배아 줄기세포인 것이 바람직하다.

[0037] 본 발명에서, "줄기세포의 장기 유지 배양"이란 일반적인 줄기세포 배양 배지를 사용하여 줄기세포 콜로니의 형태 및 전분화능을 유지하면서 복수 계대 이상 배양하는 것을 의미하며, 바람직하게는 10계대 이상 배양하는 것을 의미한다.

[0038] 상기 "전분화능(pluripotent)"이란 피부세포, 심근세포, 생식세포 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 줄기세포의 특성을 말한다. 줄기세포의 전분화능 유지 여부는 전분화능 마커인 SSEA-4, Tra-1-60, OCT4, SOX2, NANOG 및 cMYC의 발현 여부를 확인하여 판단할 수 있다.

[0039] 본 발명자들은 VNm-PVDF 지지체가 적용된 배양 플레이트에 인간 배아 줄기세포를 접종하여 10계대 이상 배양한 결과 줄기세포 콜로니의 형태에 변화가 없고, 줄기세포의 전분화능 또한 유지되는 것을 확인하여(도 6 내지 9), VNm-PVDF 지지체가 줄기세포의 장기 유지 배양 용도로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0041] 또한, 본 발명자들은 줄기세포가 심근세포로 분화하는데 있어 VNm-PVDF 지지체의 영향을 조사한 결과, VNm-PVDF 지지체, 특히 나노섬유 직경이 700 nm인 B형 VNm-PVDF 지지체에서 배양한 줄기세포가 심근세포로 더 많이 분화하는 것을 확인하였다(도 12 내지 14).

[0042] 이에 본 발명의 또 다른 양상은 (a) 줄기세포 배양용 지지체에서 줄기세포를 배양하는 단계; 및 (b) 배양된 줄기세포를 줄기세포 배양용 지지체 상에서 심근세포로 분화를 유도하는 단계;를 포함하는, 줄기세포로부터 심근세포를 분화시키는 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명에서, "세포 분화(differentiation)"란 한 세포가 특정한 구조나 기능을 갖는 세포로 변화하는 것을 말하며, 예를 들어 전분화능을 갖는 줄기세포가 피부세포, 심근세포, 신경세포 등으로 변하는 것도 분화의 일종이다.

[0044] 심근세포는 심장에서 심방 및 심실의 수축/이완을 담당하는 세포로 인간 심근세포를 확보하기 어려운 문제로 인해 심혈관 질환 신약 발굴 및 독성 검사를 위해 마우스 및 쥐 등 실험동물에서 유래한 세포들을 주로 이용하여 왔다. 그러나 최근 인간 다능성 줄기세포로부터 심근세포로의 고수율 분화에 성공한 연구가 발표되었으며, 이 연구들은 GSK3 저해제들(CHIR99021, BIO)을 사용하여 중배엽세포 계통으로의 분화를 유도한 후, 다음 단계로 Wnt 저해제들(IWP-2, IWP-4, IWR-1, XAV-939, ICG-001, Wnt-C59)을 처리함으로써 심근세포로의 분화를 유도하는 방법을 사용하고 있다(참고문헌 1 및 참고문헌 2). 그러나 상기 방법은 분화 단계가 복잡한 단점이 있다.

[0045] 본 발명에서, 상기 (b)는 배양 배지에 심근세포 분화 유도 물질을 첨가하는 등 당업계에 알려진 방법으로 수행될 수 있으며, 본 발명자들은 줄기세포를 상업용 심근세포 분화 유도 배지에서 배양하여 분화를 유도하였다. 상기 선행 심근세포 분화 방법과 비교하여 본 발명의 방법은 심근세포 분화 효율은 증가시키면서 배양 플랫폼의 교체없이 배양액의 교체만으로 분화가 가능하여 간편한 장점이 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 일 예에 따른 줄기세포 배양용 지지체는 생체적합성 물질로 이루어져 안전하며, 줄기세포 배양용 지지체를 사용하면 줄기세포의 장기 배양이 가능하고, 줄기세포로부터 심근세포를 효율적으로 분화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 줄기세포 배양용 지지체의 제작 방법을 도시한 것이다: MAP-홍합 접착 단백질

(mussel adhesive protein); VN-비트로넥틴 유래 펩타이드; 및 VNm-MAP와 VN의 융합 펩타이드.

도 2는 PVDF 분말, A형 및 B형 PVDF 지지체의 FT-IR 스펙트럼 결과를 스택 형식(A) 및 중첩 형식(B)으로 표시한 그래프이다.

도 3에서 A 및 B는 PVDF 섬유의 직경이 각각 200 nm 및 700 nm인 PVDF 지지체의 주사전자현미경(SEM) 사진이고, C는 PVDF 섬유의 직경 분포를 그래프로 표시한 것이다: A type=직경 200 nm; 및 B type=직경 700 nm.

도 4는 A형 및 B형 PVDF 지지체에 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드(VNm)을 결합시키기 전후의 주사전자현미경 사진이다.

도 5는 세포 배양 플레이트에 Matrigel, vitronectin-XF™, VNm 단독, 또는 VNm-PVDF 지지체를 적용하여 인간 배아 줄기세포(hESC)를 배양한 후 콜로니 형태를 비교한 결과이다: A-D=저배율 알칼라인 포스파타제(AP) 염색 이미지; E-H=고배율 알칼라인 포스파타제(AP) 염색 이미지; 및 I-L=명시야(bright-field) 이미지. L의 흰색 점선은 콜로니의 모양을 나타낸다.

도 6은 세포 배양 플레이트에 Matrigel, vitronectin-XF™, VNm 단독, 또는 VNm-PVDF 지지체를 적용하여 hESC를 10계대 이상 배양한 후 실험군과 대조군 사이에 전분화능 마커인 OCT4와 SOX2의 발현에 차이가 없음을 보여주는 결과이다.

도 7은 세포 배양 플레이트에 Matrigel, vitronectin-XF™, VNm 단독, 또는 VNm-PVDF 지지체를 적용시킨 후 hESC를 10계대 이상 배양하면서 세포 배가 시간을 확인한 결과이다.

도 8은 세포 배양 플레이트에 Matrigel, vitronectin-XF™, VNm 단독, 또는 VNm-PVDF 지지체를 적용하여 hESC를 10계대 이상 배양한 후 전분화능 마커인 SSEA-4, Tra-1-60 및 OCT4의 발현 수준을 형광유세포(FACS) 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 9는 세포 배양 플레이트에 Matrigel, vitronectin-XF™, VNm 단독, 또는 VNm-PVDF 지지체를 적용하여 hESC를 장기간 배양한 후 전분화능 마커인 OCT4, SOX2, NANOG 및 cMYC의 전사 수준이 대조군과 유사함을 보여주는 결과이다.

도 10은 세포 배양 플레이트에 섬유 직경과 지지체 두께가 서로 상이한 VNm-PVDF 지지체를 적용하여 hESC를 배양한 후 콜로니 형태를 명시야 이미지(상단 패널) 및 알칼라인 포스파타제(AP) 염색(하단 패널)으로 확인한 결과이다. 우측 상단 이미지의 흰색 점선은 지지체 위에 자라는 줄기세포 콜로니의 모양을 나타낸다.

도 11은 세포 배양 플레이트에 섬유 직경과 지지체 두께가 서로 상이한 VNm-PVDF 지지체를 적용하여 hESC를 10계대 이상 배양한 후 정상 핵형을 유지하고 있음을 보여주는 결과이다.

도 12는 Matrigel (MG), VNm 단독(VNm) 또는 VNm-PVDF 지지체(A type 및 B type)가 적용된 세포 배양 플레이트에서 hESC를 배양하여 심근세포로의 분화를 유도한 결과이다: A=분화 유도 8일 후 세포 콜로니 모습; 및 B=분화 유도 후 자발 박동 콜로니의 수.

도 13은 Matrigel (MG), VNm 단독(VNm) 또는 VNm-PVDF 지지체(A type 및 B type)가 적용된 세포 배양 플레이트에서 hESC를 배양하여 심근세포로의 분화를 유도한 후 심근세포 특이적 유전자인 GATA4, MYOD, TNNT2, ACTN2 및 TTN의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 14는 B형 VNm-PVDF 지지체에서 분화시킨 심근세포에서 근절-유사 구조(z 표시) 및 갭 접합(화살표 머리)을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **실험 방법**

[0053] **1. PVDF 지지체 제작 및 특성 확인**

[0054] PVDF 지지체(PVDF scaffold)는 AMO Greentech (한국 김포)에 의뢰하여 제작하였다. 간략하게 디메틸 아세트아미드 (DMAc)/아세톤(비율 60/40; Sigma-Aldrich, 미국) 혼합 용액에 PVDF (M.W. 534 K)를 용해시켜 15 중량%(wt%)의 PVDF 용액을 제조하였다. PVDF 용액을 외경이 0.9 ㎜인 노즐 팁이 있는 주사기에 로드하고, 노즐 팁과 수집기 사이의 거리를 15 ㎝로 하여 분당 200 ㎕의 유속으로 분무했다. 45 kV의 전압을 5분 동안 인가하여, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 양면 필름(평균 두께 30 ㎛) (KONE Co., Ltd., 대한민국)의 한 면에 있는 실리콘 기판 위에 PVDF 지지체를 안정적으로 생성시켰다. PVDF 지지체는 실온에서 밤새 건조시키고, 혼합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드(VNm)를 고정시킨 후 세포 배양에 사용하였다 (융합 펩타이드 고정 방법은 하기 참조).

[0055] PVDF 지지체를 갖는 PET 양면 필름의 전체 두께를 TESA μ-HITE height gauge (Tesa Technology UK Ltd., 영국)로 5개의 임의 영역에서 측정하였다. 전체 두께에서 측정된 PET 양면 필름의 두께를 빼서 전기방사된 PVDF 지지체의 두께를 확인하였다.

[0056] PVDF 지지체의 기공 크기는 CFP-1100A capillary flow porometer (Porous Materials Inc., Ithaca, NY, USA)로 확인했다. 각각의 전기방사 막 샘플에 대해 전형적인 건식 곡선 및 습식 곡선을 얻었으며, 평균 유동 기공 직경은 제조업체 (Porous Materials, Inc)에서 제공한 소프트웨어를 사용하여 자동으로 계산하였다.

[0057] PVDF 분말 및 지지체의 결정상은 한국 과학기술연구원의 특성분석 센터에서 감쇠 총 반사율-푸리에 변환 적외선 (ATR-FT-IR) 분광계 (Nicolet iS10) (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA)로 확인하였다. 각 샘플의 FT-IR 스펙트럼은 게르마늄 결정을 사용하여 32회 스캔으로 4 cm^{-1}의 해상도에서 4,000-600 cm^{-1} 범위로 측정하였다.

[0059] **2. 전자 현미경(electron microscopy)**

[0060] PVDF 지지체를 표준 백금 스퍼터로 코팅한 후에 2 kV의 가속 전압 및 SE 모드에서 주사 전자 현미경(SEM)(E-1045)(일본 도쿄, 히타치)으로 PVDF 지지체의 형태를 관찰했다. 섬유 직경은 Image-J 소프트웨어로 획득한 이미지에서 수동으로 측정했다.

[0061] PVDF 지지체에서 분화시킨 세포의 미세 구조는 다음과 같이 확인하였다. 세포 샘플을 인산염 완충 식염수(PBS)에 용해시킨 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)로 고정하고, 0.1 M 카코딜레이트 완충액(cacodylate buffer)에 용해시킨 1% 사산화 오스뮴(osmium tetroxide)으로 1시간 동안 후고정시켰다. 이후 에탄올 구배로 세포를 탈수시키고, Spurr's resin을 침투시켰다. 중합화 후에, 세포 샘플을 울트라 마이크로톰(Ultracuts)(Leica, 독일)으로 100 ㎚ 두께의 단편으로 절단했다. 세포 단편을 구리 테이프에 마운트하고 50% 메탄올에 용해된 2% 우라닐 아세테이트와 구연산 납(lead acetate)으로 염색하였다. 후방 산란 전자 모드-SEM 이미지는 T1 검출기를 사용하여 1.78 kV 전자 빔이 장착된 TeneoVS 기기 (FEI, Eindhoven, Netherlands)로 획득하였다.

[0063] **3. DNA 플라스미드 제작 및 펩타이드 정제**

[0064] 홍합 접착 단백질 (mussel adhesive protein, MAP)은 해양 홍합에서 추출한 천연 접착제로 세포 접착에 자주 사용된다. 참고문헌 3에 개시된 fp-5 서열을 기반으로 fp-5 펩타이드(서열번호 3)의 양 말단에 fp-1(서열번호 2: AKPSYPPTYK) 펩타이드가 6번 반복되는 MAP 펩타이드(서열번호 4)를 고안하고, 이 MAP 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 제작하였다. 이후 NCBI 웹사이트 (유전자 ID: 7448)에 공개된 아미노산 및 cDNA 서열을 기반으로 MAP의 C-말단에 비트로넥틴 유래의 펩타이드(서열번호 1)(이하, VN으로 기재함)를 연결시켜 융합 펩타이드(이하, VNm으로 기재함)를 코딩하는 플라스미드를 제작하였다.

[0065] 상기 플라스미드를 *E.coli* (Rosetta-gami®)(Thermo Fisher Scientific, 미국)에서 발현시키고, 1 mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)로 단백질 발현을 유도한 후, 봉입체(inclusion body)로 획득하였다. 이후 봉입체는 공지된 방법(Palmer & Wingfield, 2004)에 따라 처리하여 기능성 펩타이드 용액으로 정제하였다: 4℃에서 10분 동안 9000 rpm으로 원심분리한 후, NaOH를 사용하여 상층액의 pH를 12.5로 조정한 후 아세트산으로 중화하고, 증류수에 침전 및 재현탁시켰다. 용액을 탈염하고, Amicon® Ultra Centrifugal Filters (10-kDa) (Millipore, 미국)로 농축하고 동결 건조했다.

[0066] 표 1에 VNm 제작에 사용한 펩타이드 서열을 기재하였다.

표 1

[0067]

서열번호	설명	서열
1	vitronectin-derived peptide	KGGPQVTRGDVFTMP
2	fp-1	AKPSYPPTYK
3	fp-5	SSEEYKGGYYPGNTYHYHSGGSYHGSGYHGGYKGKYYGKAKKYYYKYKNS GKYKYLKKARKYHRKGYKKYYGGGSS
4	MAP peptide	$(AKPSYPPTYK)_6$ SSEEYKGGYYPGNTYHYHSGGSYHGSGYHGGYKGKYYGKAKKYYYKYKNS GKYKYLKKARKYHRKGYKKYYGGGSS $(AKPSYPPTYK)_6$
5	MAP peptide and vitronectin-derived peptide	$(AKPSYPPTYK)_6$ SSEEYKGGYYPGNTYHYHSGGSYHGSGYHGGYKGKYYGKAKKYYYKYKNS GKYKYLKKARKYHRKGYKKYYGGGSS $(AKPSYPPTYK)_6$ KGGPQVTRGDVFTMP

[0069] **4. PVDF 지지체에 VNm 고정**

[0070] PVDF 지지체에 10 mM의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) (AK Scientific, 미국) 용액과 20 mM 소듐 아세테이트 버퍼(pH 6.5)에 용해된 10 mM의 N-하이드록시숙시니미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) (AK Scientific) 용액을 실온에서 30분 동안 처리하여 지지체를 활성화시켰다. 이후 VNm(0.05 ㎍/㎖)을 활성화된 PVDF 지지체에 처리하여 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 증류수로 3회 세척한 후 PVDF 지지체를 완전히 건조시키고, 실온에서 보관한 후 사용하였다.

[0071] 인간 배아 줄기세포 배양을 위해 VNm이 결합된 PVDF 지지체(이하, VNm-PVDF 지지체라고 기재함)를 6-웰 플레이트의 웰 크기에 맞는 원으로 적절하게 절단하고, 70% 에탄올에 10분 동안 담가서 멸균시켰다. 이후 VNm-PVDF 지지체를 실온에서 건조시키고 6-웰 플레이트의 바닥에 놓은 후 세포를 배양하였다.

[0072] 도 1에 본 발명의 일 예에 따른 VNm-PVDF 지지체의 제조 방법을 도시하였다.

[0074] **5. hESC 배양, 심근세포 분화 및 핵형 분석**

[0075] 인간 배아 줄기세포(이하, hESC로 기재함)는 WiCell (WA09, WiCell, WI USA)의 H9 라인을 사용했다. hESC는 Matrigel (BD Biosciences, 미국), vitronectin XF™ (Stemcell Technologies, 캐나다), VNm 또는 VNm-PVDF 지지체가 적용된 플레이트에서 mTeSR™ (Stemcell Technologies)으로 5% CO_2가 있는 가습 대기에서 37℃로 배양하였다. 세포는 초기에 $1x10^5$ 세포/㎠의 밀도로 플레이트에 분주하고, 플레이트에 가득 차게 자라면 1:8 내지 1:10의 비율로 새로운 플레이트에 계대배양하였다.

[0076] 심근세포 분화 유도를 위해 hESC 콜로니를 $3x10^5$ 세포/㎠의 밀도로 Matrigel, vitronectin XF™, VNm, 또는 VNm-PVDF 지지체가 적용된 플레이트에 접종하고, 제조업체의 지침에 따라 STEMdiff™ 심근 세포 분화 배지(Stemcell Technologies)에서 배양했다. 통계적 평가를 위해 심근세포 분화를 3회 이상 반복했다. 게놈 안정성을 조사하기 위해 VNm-PVDF 지지체 (GenDix, Inc., 대한민국)에서 세포를 10회 계대 후에 표준 G-banding 기법을 사용한 핵형 분석을 수행했다.

[0078] **6. 알칼라인 포스파타제 활성 시험**

[0079] 알카라인 포스파타제(alkaline phosphatase, AP) 염색은 제조업체의 지침에 따라 AP 염색 키트(Millipore)로 수행하였다. 세포를 PBS 용액에 용해시킨 3.7% 포름알데히드로 실온에서 고정시키고, Fast Red Violet 용액 및 나프톨 AS-BI 인산염 용액으로 염색하였다. AP 양성 콜로니의 이미지는 DP71 디지털 카메라(Olympus, 일본)가 장착된 IX71 위상차 현미경(Olympus)으로 획득하였다.

[0081] **7. 면역형광 염색(immunofluorescence staining)**

[0082] 세포를 4% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS로 고정시킨 다음 PBS에 용해된 0.5% Triton X-100으로 10분 동안 실온에서 투과시켰다. 2% 소 혈청 알부민(BSA)(Sigma)으로 실온에서 1시간 동안 세포를 블록킹한 후, 세포를 항-OCT-4 (1:400, Thermo Fisher Scientific, 미국) 또는 항-SOX2 (1:200, Abcam, 영국) 항체와 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 PBS로 세 번 세척한 후 Alexa Fluor® 546 또는 488-접합 2차 항체(Thermo Fisher Scientific)와 인큐베이션하여 세포에서 표적을 시각화시켰다. 핵은 DAPI (4 ', 6-diamidino-2-phenylindole)로 대조 염색하여 시각화했다. 디지털 카메라 (Olympus) 또는 Zeiss LSM-510 공초점 현미경(Zeiss)이 장착된 형광 현미경(Olympus)으로 세포 이미지를 획득하였다.

[0084] **8. 형광유세포분석(FACS; fluorescence activated cell sorting)**

[0085] 세포를 accutase(Millipore)로 분리하고, 1% BSA-PBS 용액으로 5분 동안 블록킹한 다음 PE(phycoerythin)와 접합된 항체 (SSEA-4, TRA-1-60 및 OCT4; BD Biosciences)와 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 세포를 세척하여 1% BSA-PBS 500 ㎕에 재현탁시키고, Guava® easyCyte™를 사용하여 세포를 계수하였다. 데이터는 Guava InCyte 소프트웨어(Millipore)로 분석하였다.

[0087] **9. 정량적 역전사 중합 효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)**

[0088] 총 RNA는 TRIzol(Cosmo Genetech, 대한민국)과 함께 LaboPass™ Kit로 추출하였다. 총 RNA 1 ㎍으로 M-MLV 역전사 효소 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 StepOnePlus™ 실시간 PCR 시스템 (Thermo Fisher Scientific)으로 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 정량적 유전자 발현은 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 수준으로 정규화시켰다. 사용한 프라이머 서열은 표 2에 기재하였다.

표 2

[0089]

유전자	전방향 프라이머	역방향 프라이머
GATA4	CGA CAC CCC AAT CTC GAT ATG	GTT GCA CAG ATA GTG ACC CGT
ACTN2	CAA ACC TGA CCG GGG AAA AAT	CTG AAT AGC AAA GCG AAG GAT GA
TNNT2	ACA GAG CGG AAA AGT GGG AAG	TCG TTG ATC CTG TTT CGG AGA
MYOD	CCG CCT GAG CAA AGT AAA TGA	GCA ACC GCT GGT TTG GAT T
TTN	TCA AGA CAA ACC CGA ATT GA	GAG GCA CTT CAG GAC CTG TG
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

[0091] **10. 데이터 획득 및 표시**

[0092] 모든 실험 및 결과 측정은 최소 세 번씩 수행하였고, 데이터는 평균±SEM으로 기재하였다.

[0095] **실험 결과**

[0096] **1. PVDF 지지체의 특성 확인**

[0097] 전기방사를 통해 섬유 직경이 200 ㎚ (A형) 및 700 ㎚ (B형)인 두 가지 유형의 PVDF 지지체를 제조하였다. 전기방사된 PVDF 지지체는 압전성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, PVDF 지지체는 변형될 때 자발적으로 전하를 생성한다. 특히, 전하는 지지체가 5개의 가능한 결정 다형체 (α, β, γ, δ 및 ε 상) 중에서 β-상을 주로 포함할 때 발생하는 것으로 알려져 있다(참고문헌 4). 따라서, PVDF 지지체의 결정상을 평가하기 위해 FT-IR

분석을 수행하였다.

[0098] 분석 결과, PVDF 분말(원물질)과 A형 및 B형 PVDF 지지체의 FT-IR 스펙트럼은 614, 763, 796, 874, 975, 1072 cm^{-1} 및 840, 1174, 1276 cm^{-1}에 위치한 특징적인 밴드를 나타내는 것을 확인하였다. 구체적으로 PVDF 분말의 스펙트럼은 614, 763, 796 및 975 cm^{-1}에서 유의미한 밴드를 보였으며, 이는 α-상 함량이 우세함을 나타낸다. 대조적으로, 전기방사된 PVDF 지지체는 614, 763, 796 및 975 cm^{-1}에서는 밴드가 소실되는 반면, 840 및 1276 cm^{-1}의 파장에서 증가된 투과율을 나타냈다(도 2의 A 및 B). 이 결과는 전기 방사 과정에서 PVDF의 α-상에서 β-상으로의 분자 재배열을 시사한다(참고문헌 5). 또한 PVDF 지지체에서는 874 cm^{-1}의 밴드가 880 cm^{-1}로 이동하는 것을 알 수 있었다(도 2). 880 cm^{-1}의 밴드가 CF_2-CH_2 굽힘 진동(bending vibration)의 비정질 위상에 해당한다는 점을 고려하면, 이 변화는 전기 방사 프로세스에 의해 PVDF의 비정질 영역에서 분자 재배열이 유도되었음을 의미한다. 상기 결과를 통해 전기방사된 PVDF 지지체가 극성 및 전기활성 (electroactive) β-상 결정 구조를 포함한다는 것을 확인하였다.

[0099] 또한, SEM(scanning electron microscope)에 의한 형태학적 검사 결과 각 PVDF 지지체가 상대적으로 일정한 직경 및 균질한 분포를 갖는 섬유로 구성되어 있음을 알 수 있었다(도 3의 A 및 B). 나노섬유 사이에 형성된 기공은 연속적으로 연결되어 있었으며, 기공 크기는 A형 PVDF 지지체는 0.61±0.02 ㎛, B형 PVDF 지지체는 1.42±0.06 ㎛ (각 지지체에 대해 n=3, 평균±SD)인 것을 확인하였다. PVDF 비드는 거의 형성되지 않았다. A형 PVDF 지지체의 섬유는 B형 PVDF 지지체와 비교하여 평균 200 ㎚의 직경을 가지면서 더 좁은 범위의 섬유 직경을 갖는 것으로 나타났다 (도 3의 C).

[0100] VNm-PVDF 지지체에서도 유사한 형태학적 특징을 확인할 수 있었고, 이는 VNm을 결합시켜도 PVDF 지지체의 무결성(integrity)이 변형되지 않았음을 의미한다. 특히, VNm으로 보이는 물질이 PVDF 지지체와 지지체 사이에 증착된 것을 확인할 수 있었다(도 4). 본 결과를 통해, 본 발명자들은 VNm 및 PVDF 지지체 모두가 접종된 세포와 접촉하여 기질 역할을 할 수 있다고 추측하였다.

[0102] **2. VNm-PVDF 지지체에서 인간 배아줄기세포 배양**

[0103] VNm-PVDF 지지체가 hESC의 부착 및 생장에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, Matrigel 및 vitronectin-XF™ (상업용 세포외 기질 -양성대조군으로 사용)을 코팅한 경우와 마찬가지로, hESC를 VNm만 코팅한 플레이트에서 배양했을 때 플레이트에 잘 부착하고 안정적으로 생장하여 콜로니를 형성하는 것을 확인하였다(도 5의 C, G 및 K). 이는 비트로넥틴-유래 펩타이드(VN)가 MAP와 융합된 경우에도 상업용 세포외 기질과 마찬가지로 세포의 부착을 지원한다는 것을 의미한다.

[0104] 이후 VNm-PVDF 지지체에서 배양한 hESC의 형태(도 5의 D, H 및 L; 세포 이미지는 두께가 5 ㎛인 B형 지지체에서 얻음)를 다른 실험군(2D로 표시)에서 배양한 hESC와 비교하였다. 그 결과, PVDF 막의 불투명성으로 인한 어려움에도 불구하고 VNm-PVDF 지지체에서 배양한 경우에도 hESC 콜로니의 전형적인 형태를 분명히 확인할 수 있었다(도 5의 L).

[0105] 또한, VNm-PVDF 지지체가 hESC의 부착 및 생장에 얼마나 영향을 미치는지 정성적으로 확인하기 위해 알칼라인 포스파타제(AP) 염색을 수행했다. 그 결과, VNm-PVDF 지지체에서 hESC를 배양해도 전형적인 형태가 유지되는 것을 확인하여 다른 기존 2D 배양 조건에서 배양한 hESC와 구별할 수 없었다 (도 5의 A 내지 H). 따라서, 본 발명자들은 더 오랜 기간 동안 hESC를 배양하였다.

[0107] **3. VNm-PVDF 지지체에서 hESC의 장기 배양**

[0108] 장기간 배양에서 줄기세포의 미분화 상태를 안정적으로 유지하는 것은 새로운 배양 플랫폼이 해결해야 하는 가장 중요한 속성 중 하나이다. 본 발명의 VNm-PVDF 지지체가 hESC의 미분화 상태를 장기적으로 유지할 수 있는지 확인하기 위해 hESC를 10회 계대에 걸쳐 계속 배양했다.

[0109] 배양 결과, hESC를 여러 번 계대하더라도 계속해서 세포가 생장하고 hESC 콜로니의 전형적인 형태를 유지하는 것을 확인하였다(도 6에서 VNm-PVDF). 또한, VNm-코팅 단독(VNm-2D) 또는 VNm-PVDF 지지체(VNm-PVDF)에서 배

양한 세포의 배가 시간은 다른 실험군과 유의미한 차이 없이 계대에 따라 감소하거나 증가하지 않는 것을 알 수 있었다 (도 7).

[0110] 10회 계대 후에 수행된 면역화학적 분석에서는 형태학적 관찰과 일관된 결과를 확인할 수 있었다. 구체적으로 미분화 hESC에 대한 마커인 OCT4 (octamer-binding transcription factor 4) 및 SOX2 (SRY-Box Transcription Factor 2)에 대한 면역 반응성이 대부분의 콜로니 내에서 분명하게 나타났으며, 이는 hESC를 장시간 배양하는 경우 VNm-PVDF 지지체에서 유의미한 자발적 분화가 없었음을 나타낸다. 전분화능 마커인 SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4), Tra-1-60 및 OCT4에 대한 형광유세포 분석 결과를 통해서도 대부분의 세포가 모든 마커에 대해 양성인 것을 확인할 수 있었다(도 8). 또한, qRT-PCR로 다능성 마커의 발현을 조사한 결과, VNm-PVDF 지지체로 배양한 hESC에서 OCT4, SOX2, NANOG 및 cMYC의 발현 수준이 Matrigel 실험군과 크게 다르지 않음을 확인하였다(도 9).

[0111] PVDF 지지체의 두께가 hESC의 부착 및 형태에 미치는 영향을 테스트하기 위해 3 ㎛ 및 5 ㎛ 두께의 PVDF 지지체 2개를 제작하고, VNm으로 코팅하여 hESC를 배양하였다. 배양 결과, hESC가 대조군 세포외 기질이 코팅된 플레이트뿐만 아니라 상기 두 지지체 모두에 부착하여 10계대 이상 생장하는 것을 확인하였다. hESC의 콜로니는 섬유의 직경과 지지체의 두께가 증가함에 따라 두꺼워지고 크기가 감소하는 경향이 있었다. 그러나 AP 염색 결과, 시험된 모든 VNm-PVDF 지지체 실험군에서 강한 반응성을 확인하여 hESC가 정상 형태를 유지하는 것을 알 수 있었다(도 10).

[0112] 또한, 핵형 분석 결과 지지체 두께와 섬유 직경과 무관하게 10회 계대에 걸쳐 hESC의 염색체에 이상이 없음을 알 수 있었다 (도 11). 이러한 결과는 VNm-PVDF 지지체가 복수 계대에 걸쳐 hESC의 부착과 안정적인 배양을 효율적으로 지원할 수 있음을 시사한다.

[0114] **4. VNm-PVDF 지지체에서 hESC의 심근세포로의 분화**

[0115] 상기 도 2에서 PVDF 나노섬유는 압전성을 가지는 β-상 결정 구조로 이루어져 있음을 보였다. 압전성(piezoelectricity)은 구조 변형에 의해 물질 자체가 전기를 발생하는 성질로서 본 지지체의 이러한 특성은 줄기세포가 전기적 활성을 가져야 하는 세포(예, 신경세포, 심근세포 등)로의 분화에 영향을 줄 수 있다. 따라서 본 발명자들은 VNm-PVDF 지지체가 hESC의 심근세포로의 분화를 촉진하는지 여부를 조사했다. 구체적으로 Matrigel 코팅 또는 VNm-코팅 플레이트에서 배양한 hESC와 섬유 직경이 다른 두 VNm-PVDF 지지체(A형 및 B형)에서 배양한 hESC의 분화 정도를 비교하였다.

[0116] 8일 후, 여러 개의 소형(compact) 콜로니가 배양 웰에 나타나는 것을 확인하였으며(도 12의 A), 그중 일부는 자발적으로 박동하기 시작하는 것을 알 수 있었다(데이터는 제시하지 않음). 또한, 2주 동안의 분화 결과, 다른 실험군과 비교하여 두 VNm-PVDF 지지체 모두에서 자발적으로 박동 콜로니가 더 많은 것을 확인하였다. 그러나 Matrigel 코팅 또는 VNm-코팅 플레이트에서는 박동하는 콜로니를 거의 확인할 수 없었다(도 12의 B). B형 지지체가 A형 지지체보다 더 많은 박동 콜로니를 생성하는 경향이 있었지만 이 차이는 통계적으로 유의하지 않았다 ($p=0.23$, $n=6$).

[0118] 또한, 정량적 유전자 발현 분석으로 심근세포 분화 정도를 평가하였다. 평가 결과, 미분화된 인간 배아줄기세포와 비교하여 분화된 세포에서 GATA4 (GATA binding protein 4), MYOD (myoblast determination protein 1), TNNT2 (troponin T2), ACTN2 (Actinin Alpha 2) 및 TTN (titin)과 같은 심근세포 특이적 마커 유전자의 발현이 증가하였음을 확인하였다(도 13). 이러한 결과는 이는 모든 실험군에서 배양 조건이 심근 분화에 적합했음을 의미한다.

[0119] 구체적으로 A형 PVDF 지지체에서 배양된 세포는 Matrigel 또는 VNm-코팅 지지체에서 배양된 세포에 비해 GATA4 및 ACTN4의 발현이 유의하게 증가하였고 (도 13), 이는 A형 지지체에서 박동 콜로니의 수가 증가한 결과와 일치한다. 특히, B형 PVDF 지지체에서 분화된 세포는 모든 실험군 중에서 가장 높은 수준으로 모든 심근 유전자의 발현이 증가하였다 (도 13).

[0120] 또한 성숙한 심근세포(cardiomyocyte)의 마커인 TNNT2 (cTnT라고도 함) 및 TTN은 B형 PVDF 지지체 실험군에서만 유의하게 상향 조절되는 것을 알 수 있었다 (도 13). 이러한 결과는 두 VNm-PVDF 지지체가 자가-박동 콜로니를 생성하는 능력은 유사할 수 있지만, B형 PVDF 지지체가 A형 PVDF 지지체보다 성숙한 심근세포의 형성을 더

현저하게 유도했음을 의미한다. B형 PVDF 지지체의 이러한 능력은 근절-유사 구조(z 표시) 및 갭 접합(화살표 머리)과 같은 심근세포에 대한 초-구조적 특성의 관찰을 통해 추가로 확인할 수 있었다 (도 14).

[0121] 종합하면, 본 발명의 VNm-PVDF 지지체는 인간 배아줄기세포의 심근 분화에 현저히 유리한 영향을 미치므로 새로운 심근 분화 플랫폼으로 사용될 수 있다.

[0123] [참고문헌]

[0124] 1. Xiaojun Lian, Cheston Hsiao, Gisela Wilson, Kexian Zhu, Laurie B Hazeltine, Samira M Azarin, Kunil K Raval, Jianhua Zhang, Timothy J Kamp, Sean P Palecek. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 2012 Jul 3;109(27):E1848-57. doi: 10.1073/pnas.1200250109.

[0125] 2. Xiaojun Lian 1, Jianhua Zhang, Samira M Azarin, Kexian Zhu, Laurie B Hazeltine, Xiaoping Bao, Cheston Hsiao, Timothy J Kamp, Sean P Palecek. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/β-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013 Jan;8(1):162-75. doi: 10.1038/nprot.2012.150. Epub 2012 Dec 20.

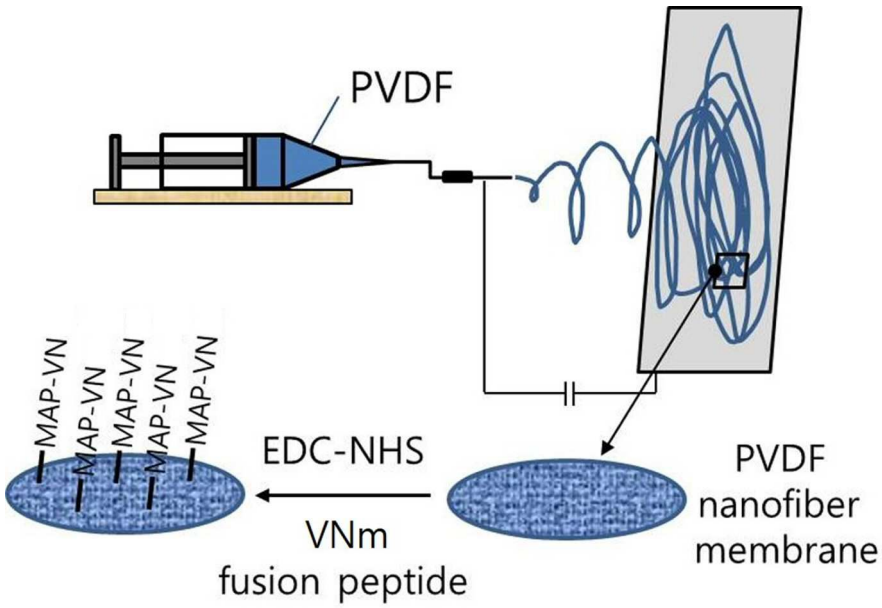
[0126] 3. Hwang, D. S., Sim, S. B., & Cha, H. J. (2007). Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. *Biomaterials*, 28, 4039-4046. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.028

[0127] 4. Li, Y., Liao, C., & Tjong, S. C. (2019). Electrospun Polyvinylidene Fluoride-Based Fibrous Scaffolds with Piezoelectric Characteristics for Bone and Neural Tissue Engineering. *Nanomaterials*, 9.doi:10.3390/nano9070952

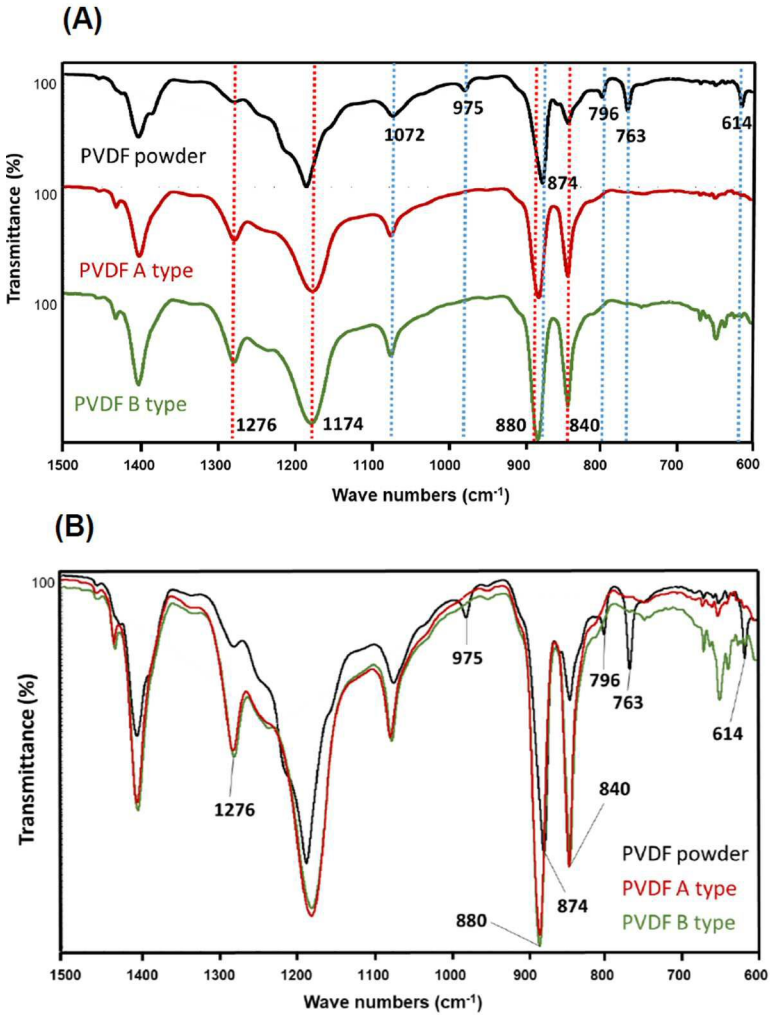
[0128] 5. Lins, L. C., Wianny, F., Livi, S., Dehay, C., Duchet-Rumeau, J., & Gerard, J. F. (2017). Effect of polyvinylidene fluoride electrospun fiber orientation on neural stem cell differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 105, 2376-2393.doi:10.1002/jbm.b.33778.

도면

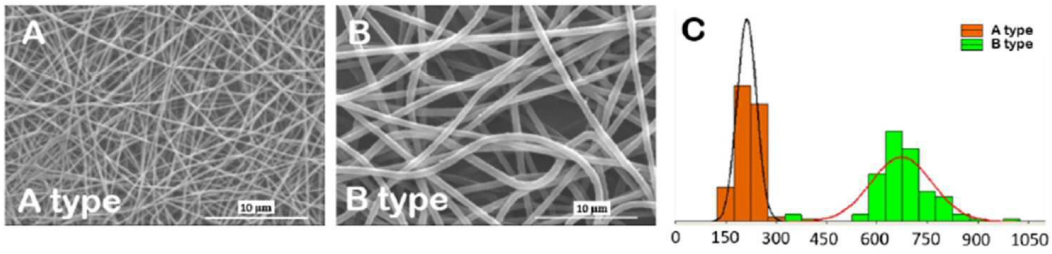
도면1



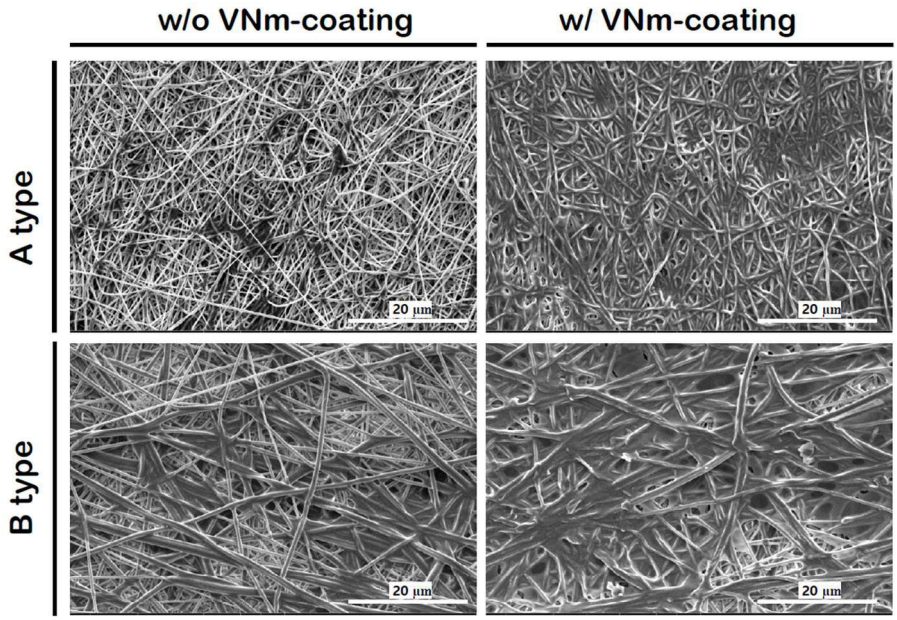
도면2


(A)
Transmittance (%)
100
100
100
PVDF powder
PVDF A type
PVDF B type
1072
975
796
763
614
874
1276
1174
880
840
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
Wave numbers (cm-1)
(B)
Transmittance (%)
100
975
796
763
614
1276
840
874
880
PVDF powder
PVDF A type
PVDF B type
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
Wave numbers (cm-1)

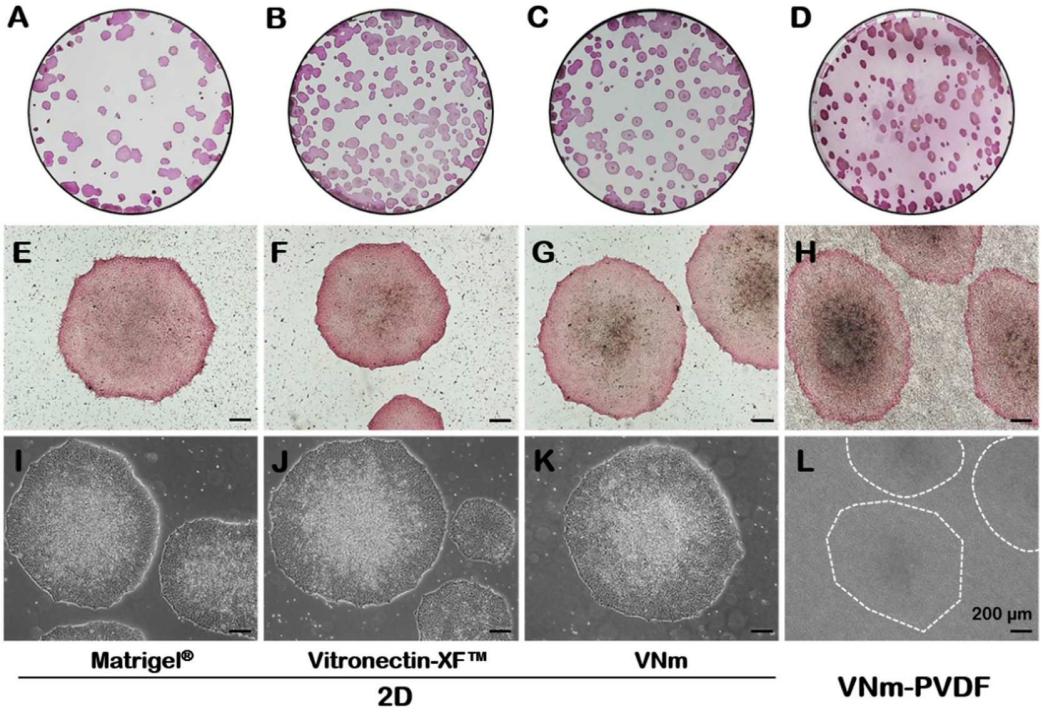
도면3


A
A type
10 μm
B
B type
10 μm
C
A type
B type
0
150
300
450
600
750
900
1050

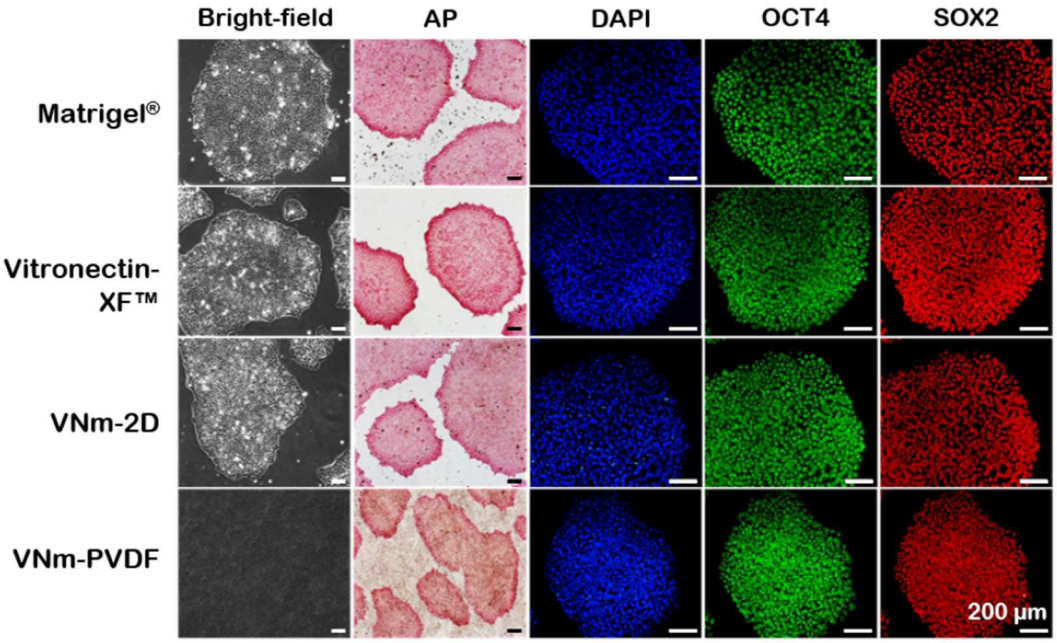
도면4


w/o VNm-coating
w/ VNm-coating
A type
B type
20 μm
20 μm
20 μm
20 μm

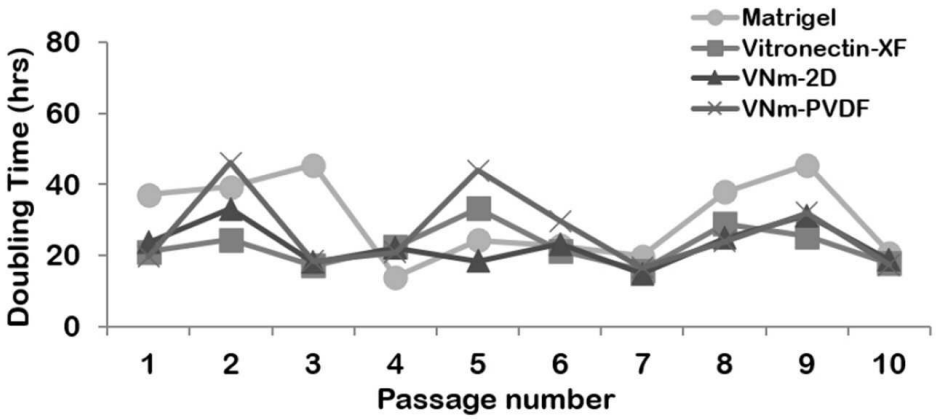
도면5


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
200 μm
Matrigel®
Vitronectin-XF™
VNm
2D
VNm-PVDF

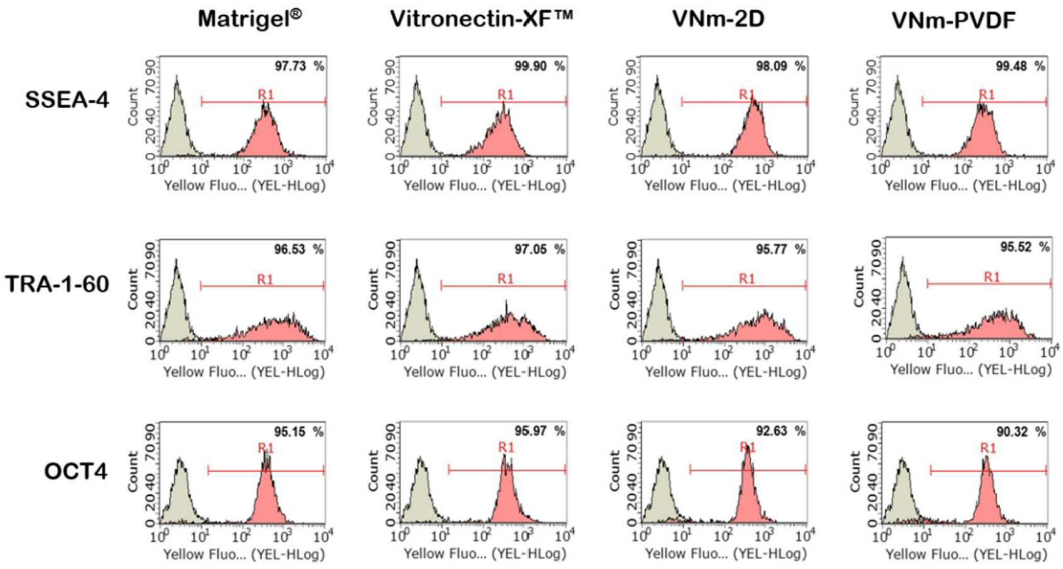
도면6


Bright-field
AP
DAPI
OCT4
SOX2
Matrigel®
Vitronectin-XF™
VNm-2D
VNm-PVDF
200 μm

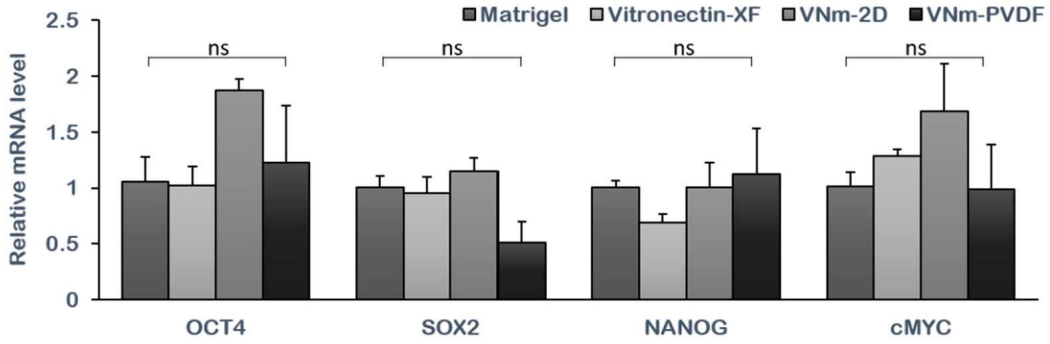
도면7


Matrigel
Vitronectin-XF
VNm-2D
VNm-PVDF
Doubling Time (hrs)
0
20
40
60
80
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Passage number

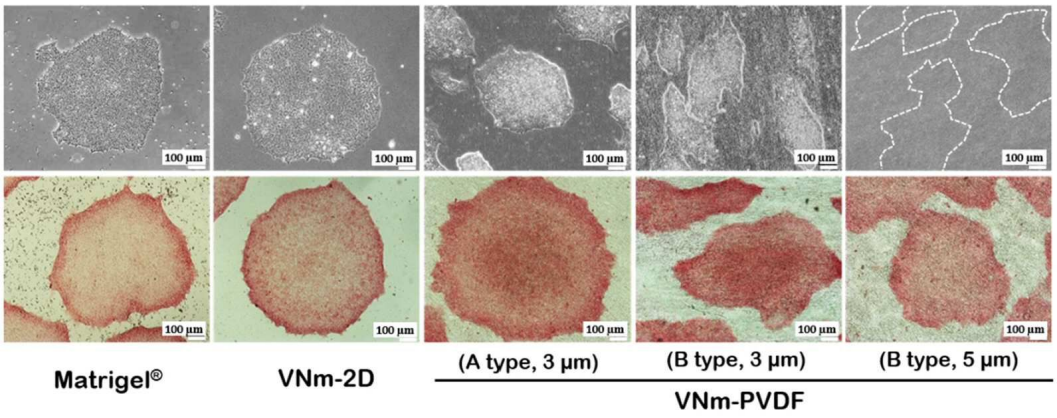
도면8


Matrigel®
Vitronectin-XF™
VNm-2D
VNm-PVDF
SSEA-4
TRA-1-60
OCT4
97.73 %
99.90 %
98.09 %
99.48 %
96.53 %
97.05 %
95.77 %
95.52 %
95.15 %
95.97 %
92.63 %
90.32 %
R1
Count
Yellow Fluo... (YEL-HLog)

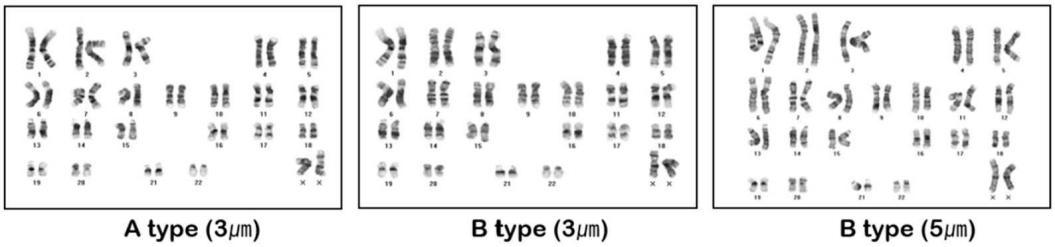
도면9


Matrigel
Vitronectin-XF
VNm-2D
VNm-PVDF
Relative mRNA level
2.5
2
1.5
1
0.5
0
ns
OCT4
SOX2
NANOG
cMYC

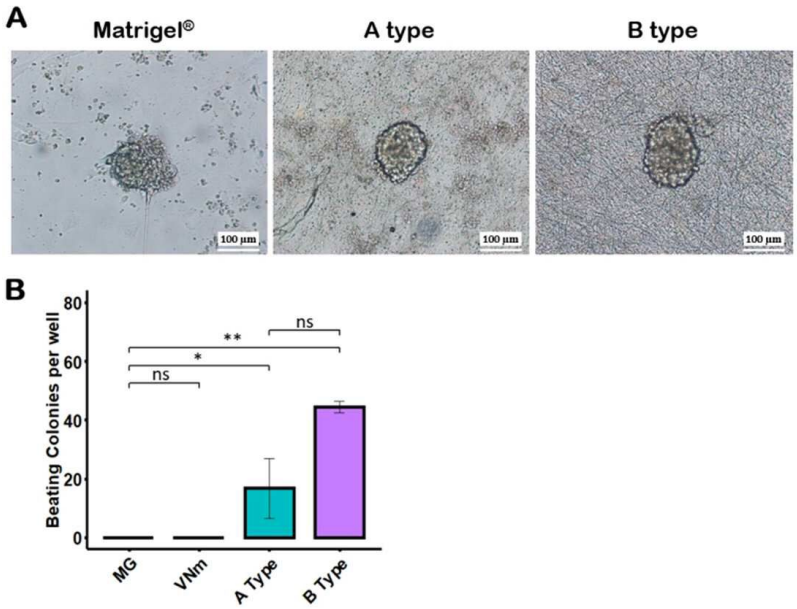
도면10


100 μm
Matrigel®
VNm-2D
(A type, 3 μm)
(B type, 3 μm)
(B type, 5 μm)
VNm-PVDF

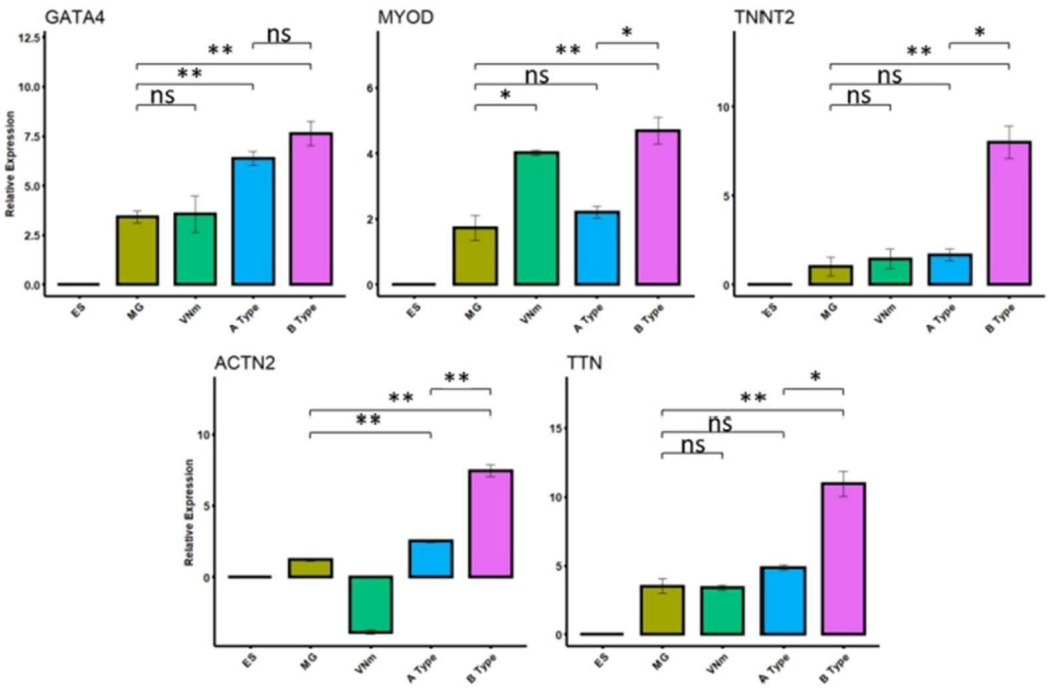
도면11



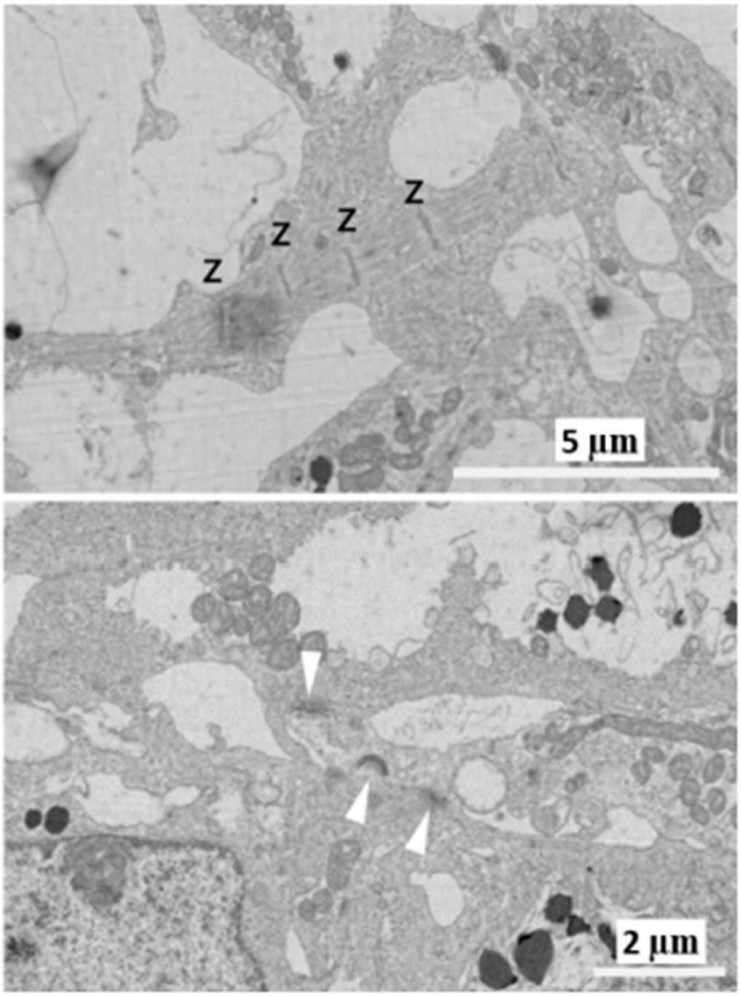
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> CULTURING SCAFFOLD FOR STEM CELL CULTURE AND USES THEREOF

<130> DP-2020-0014P1_P20U13C1963

<150> KR 10-2020-0051037

<151> 2020-04-27

<160> 17

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> vitronectin-derived peptide

<400> 1

Lys Gly Gly Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe Thr Met Pro
1 5 10 15

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> fp-1 peptide
<400> 2
Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys
1 5 10

<210> 3
<211> 76
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> fp-5 peptide
<400> 3
Ser Ser Glu Glu Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His
1 5 10 15
Tyr His Ser Gly Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr
20 25 30

Lys Gly Lys Tyr Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys
35 40 45
Asn Ser Gly Lys Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg
50 55 60
Lys Gly Tyr Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Gly Ser Ser
65 70 75

<210> 4
<211> 196
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> MAP peptide
<400> 4

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro

1 5 10 15

Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys

20 25 30

Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr

35 40 45

Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ser Ser Glu Glu

50 55 60

Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His Tyr His Ser Gly

65 70 75 80

Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr

85 90 95

Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly Lys

100 105 110

Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys

115 120 125

Lys Tyr Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr

130 135 140

Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser

145 150 155 160

Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys

165 170 175

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro

180 185 190

Pro Thr Tyr Lys

195

<210> 5

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAP peptide and vitronectin-derived peptide

<400> 5

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro

1 5 10 15

Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys

20 25 30

Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr

35 40 45

Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ser Ser Glu Glu

50 55 60

Tyr Lys Gly Gly Tyr Tyr Pro Gly Asn Thr Tyr His Tyr His Ser Gly

65 70 75 80

Gly Ser Tyr His Gly Ser Gly Tyr His Gly Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr

85 90 95

Tyr Gly Lys Ala Lys Lys Tyr Tyr Tyr Lys Tyr Lys Asn Ser Gly Lys

100 105 110

Tyr Lys Tyr Leu Lys Lys Ala Arg Lys Tyr His Arg Lys Gly Tyr Lys

115 120 125

Lys Tyr Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr

130 135 140

Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser

145 150 155 160

Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys

165 170 175

Ala Lys Pro Ser Tyr Pro Pro Thr Tyr Lys Ala Lys Pro Ser Tyr Pro

180 185 190

Pro Thr Tyr Lys Lys Gly Gly Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe

195 200 205

Thr Met Pro

210

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> GATA4 forward primer

<400> 6

cgacacccca atctcgatat g 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GATA4 reverse primer

<400> 7

gttgcacaga tagtgacccg t 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACTN2 forward primer

<400> 8

caaacctgac cggggaaaaa t 21

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACTN2 reverse primer

<400> 9

ctgaatagca aagcgaagga tga 23

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNNT2 forward primer

<400> 10

acagagcgga aaagtgggaa g 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNNT2 reverse primer

<400> 11

tcgttgatcc tgtttcggag a 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MYOD forward primer

<400> 12

ccgcctgagc aaagtaaatg a 21

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MYOD reverse primer

<400> 13

gcaaccgctg gtttggatt 19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TTN forward primer

<400> 14

tcaagacaaa cccgaattga 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TTN reverse primer

<400> 15

gaggcacttc aggacctgtg 20

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH forward primer

<400> 16

gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH reverse primer

<400> 17

gaagatggtg atgggatttc 20