

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0082774

(43) 공개일자 2022년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 1/00 (2006.01) C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/42 (2017.01) G03F 7/16 (2006.01)

G03F 7/20 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12M 23/20 (2013.01)

C12M 25/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0176666

(22) 출원일자 2021년12월10일

심사청구일자 2021년12월10일

(30) 우선권주장

1020200172652 2020년12월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김동휘

서울특별시 성북구 동소문로44길 17, 101동 1302호(하월곡동, 성북힐스테이트)

이건희

서울특별시 성북구 보문로34나길 12, 502호(동선동3가)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

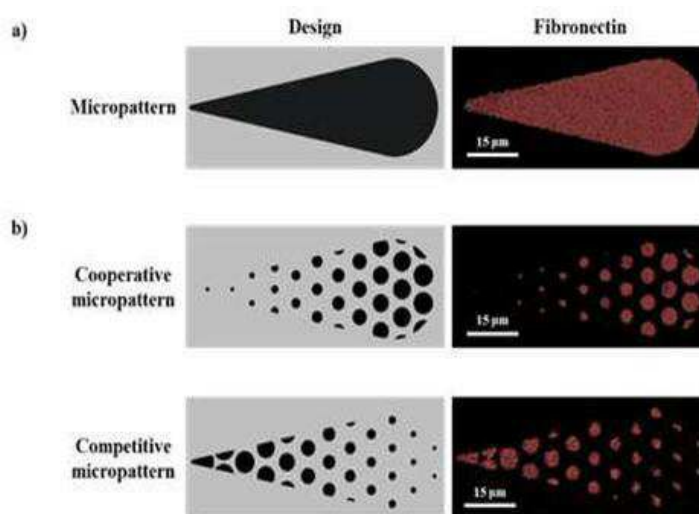
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 세포 극성 조절이 가능한 세포외기질 단백질의 미세 패턴닝

(57) 요약

본 발명은 세포의 이동을 제어할 수 있는 방법 및 이를 이용한 세포 배양 플랫폼에 관한 것이며, 보다 상세하게는 세포가 부착할 수 있는 세포외기질 단백질의 모양, 크기, 위치를 제어하여 세포의 분극을 유도함으로써 세포의 이동을 원하는 방향으로 유도하는 방법 및 이를 이용한 세포 배양 플랫폼에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 35/06 (2013.01)

G03F 7/162 (2013.01)

G03F 7/2004 (2013.01)

(72) 발명자

한성범

서울특별시 도봉구 노해로69가길 54, 404동 101호
(창동, 현대4차아파트)

조주현

경기도 구리시 건원대로76번길 134

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711109955

과제번호 2019R1A2C2004437

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 면역세포의 물리적 환경 감지 및 기계적 신호 전달에 의한 면역 반응 조절 기전 규

명

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711120246

과제번호 2020-0-01819-001

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 정보통신기획평가원

연구사업명 정보통신방송혁신인재양성(R&D)

연구과제명 ICT명품인재양성

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2020.07.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 미세 패턴이 형성된 기판에 있어서,

상기 미세 패턴은 길이가 같은 2개의 직선의 각 말단은 서로 접하여 예각을 형성하고, 다른 각 말단은 직선 또는 곡선으로 서로 연결되며, 그리고 상기 예각의 이등분선을 중심으로 하여 대칭인 모양을 갖는 형상을 나타내고, 및

상기 미세 패턴의 모양은 상기 미세 패턴 내 일정한 모양을 갖는 복수의 미세 조절 패턴들의 배열에 의해 형성되고, 상기 복수의 미세 조절 패턴들은 상기 미세 패턴의 어느 한 쪽 말단으로의 방향성을 나타내도록 패터닝된 것인 기판.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하나의 미세 패턴의 전체 면적은 500 내지 2000 μm^2 인 기판.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 미세 패턴은 연꼴(kite) 모양, 삼각형 모양, 부채꼴 모양 및 물방울 모양 중에서 선택되는 하나의 모양을 갖는 형상을 나타내는 기판.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 미세 조절 패턴들은 점, 원, 및 다각형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 모양을 갖는 것인, 기판.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단으로의 방향성은 미세 패턴 내에 배열된 상기 미세 조절 패턴들의 크기 및/또는 상기 미세 조절 패턴들 간의 간격(gap)의 변화를 통해 나타나는 것인 기판.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 미세 조절 패턴들은 그 크기가 상기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단 방향으로 갈수록 점점 작아지거나 커지도록 배열된 것인 기판.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 미세 패턴 내 배열된 상기 미세 조절 패턴들 간의 간격이 상기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단 방향으로 갈수록 점점 작아지거나 커지도록 배열된 것인 기관.

청구항 8

제 5항 있어서,

상기 미세 조절 패턴들은 상기 미세 조절 패턴들의 크기 및 상기 미세 조절 패턴들 사이의 간격이 각각 상기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단 방향으로 갈수록 점점 작아지거나 커지도록 배열된 것인 기관.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 미세 조절 패턴은 세포 외 기질 단백질로 패턴닝 되는 것인 기관.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 세포 외 기질 단백질은 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen), 라미닌(laminin), 젤라틴(gelatin) 및 폴리-D-라이신(PDL)로부터 선택되는 것인 기관.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 미세 조절 패턴은 서로 다른 농도의 세포 외 기질 단백질로 패턴닝된 것인 기관.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 기관에 방향성을 갖도록 형성된 미세 패턴은 세포의 극성을 유도하여 세포를 이동시키는 것을 특징으로 하는 기관.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 기관을 포함하는 세포 배양 플랫폼.

청구항 14

제 13항의 기관 또는 이를 포함하는 세포 배양 플랫폼에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포의 이동을 제어하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 세포는 상기 기관 내 형성된 미세 패턴 및 미세 조절 패턴의 방향성에 따라 분극화되어 이동하는 것인 세포의 이동을 제어하는 방법.

청구항 16

제 13항의 기관 또는 이를 포함하는 세포 배양 플랫폼에서 세포를 배양하는 단계; 및

상기 기관에서 상기 세포의 이동 정도를 평가하는 단계;를 포함하는 세포의 노화 정도를 평가하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포의 이동을 제어할 수 있는 방법 및 이를 이용한 세포 배양 플랫폼에 관한 것이며, 보다 상세하게는 세포가 부착할 수 있는 세포외기질 단백질의 모양, 크기, 위치를 제어하여 세포의 분극을 유도함으로써 세포의 이동을 원하는 방향으로 유도하는 방법 및 이를 이용한 세포 배양 플랫폼에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체의 조직과 장기는 세포와 세포 주변의 세포외기질 단백질(extracellular matrix)로 구성되며 이들의 상호작용을 통해 다양한 세포 거동이 조절된다. 세포는 끊임없이 주변의 물리적인 환경을 감지(mechanosensing)하고 외부 자극을 전달(mechanotransduction) 함으로써 세포 생리를 조절(mechanoregulation) 한다. 특히 세포의 이동 현상은 배아 발생 동안의 조직 형성, 상처 치유 및 면역 반응과 같이 신체 내의 활동을 발달과 유지에 있어 필수적인 역할을 한다. 이러한 세포의 이동은 이미 잘 알려진 화학적 신호에 대한 반응(chemotaxis) 뿐만 아니라 물리적인 환경 차이에 의해서는 나타난다(durotaxis). 일반적으로 세포는 물성이 강한(단단한) 물질 위에서 세포 접착 단백질(focal adhesion)의 크기가 증가한다. 세포가 붙는 표면의 물리적 특성(강도)에 따른 세포소기관의 변화는 세포가 물성이 약한 표면에서 강한 표면으로의 이동을 선호하도록 한다. 이러한 durotaxis를 유도하기 위한 세포 배양 플랫폼으로 기존에는 하이드로겔(hydrogel)이 많이 사용되고 있다. 하이드로겔은 고분자와 가교결합제의 농도 조절을 통해 물성을 쉽게 바꿀 수 있다는 장점을 가진다. 최근에는 빛에 감응하는 가교결합제나 하이드로겔을 합성하는 판의 높이 조절을 통해 가교결합제 농도를 조절하여 여러 물성을 동시에 가지는 하이드로겔을 합성하여 durotaxis 연구에 활용하고 있다. 하지만 같은 조건에서도 균일한 하이드로겔을 합성하기 어렵고 빛 조사기나 합성판과 같은 다른 도구들이 필요하다는 단점이 있으며, 하이드로겔의 높이로 인해 공초점 현미경을 이용한 세포소기관들에 대한 정밀 분석이 어렵다는 한계를 가지고 있다. 세포 생리 연구나 조직 재생 응용에서 필수적인 세포의 생리 현상인 세포의 이동은 다양한 세포소기관들의 형성과 재배열에 의해서 나타나는 결과로 정밀 분석 및 정밀 유도가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 한국공개특허문헌 KR10-2007-0006781A(2007.01.11)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] Durotaxis를 유도하는 방법은 일반적으로 고분자 하이드로겔을 합성하는 과정에서 필요한 가교결합제(cross-linker)를 빛이나 농도를 조절하는 방법 등을 사용한다. 이러한 방식을 통해 하이드로겔을 합성하기 위해서는 빛 조사기나 가교결합제의 농도를 제어할 수 있는 부가적인 장치들이 필수적이며, 같은 방법으로 하이드로겔을 합성하더라도 균일한 물성의 하이드로겔을 일정하게 제작하기 쉽지 않다는 문제가 발생한다. 또한, 이러한 방식

으로 합성된 하이드로겔의 두께에 따라 공초점 현미경 (Confocal microscopy)를 이용한 고해상도의 현미경 분석이 어렵다는 단점을 가진다.

[0005] 이에 본 발명은 추가적인 장비 없이 세포외기질 단백질의 미세 패터닝을 통하여 세포의 선택적 이동 현상을 유도할 수 있고 세포의 접착과 이동과 같은 세포의 기능 조절 연구를 가능하게 할 수 있는 세포외기질 단백질의 미세 패터닝 기술을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 세포의 부착을 유도할 수 있는 세포외기질 단백질 (Extracellular matrix)을 기관에 전사하여 특정한 형태로 패터닝함으로써 세포가 그 패터닝된 형태 및 방향성에 따라 이동하는 것을 확인함으로써 기존의 하이드로겔 기반 durotaxis 모델에서 존재하던 문제를 해소시킬 수 있음을 증명하였다.

[0007] 구체적으로, 본 발명은

[0008] 하나 이상의 미세 패턴이 형성된 기관에 있어서,

[0009] 상기 미세 패턴은 길이가 같은 2개의 직선의 각 말단은 서로 접하여 예각을 형성하고, 다른 각 말단은 직선 또는 곡선으로 서로 연결되며, 그리고 상기 예각의 이등분선을 중심으로 하여 대칭인 모양을 갖는 형상을 나타내고, 및

[0010] 상기 미세 패턴의 모양은 상기 미세 패턴 내 일정한 모양을 갖는 복수의 미세 조절 패턴들의 배열에 의해 형성되고, 상기 복수의 미세 조절 패턴들은 상기 미세 패턴의 어느 한 쪽 말단으로의 방향성을 나타내도록 패터닝된 것인 기관을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 기관을 포함하는 세포 배양 플랫폼을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 사용된 용어 “미세 패턴”은 세포 분극화를 유도하여 한 방향으로 세포가 이동하도록 디자인된 전체 모양 또는 형상을 의미한다. 구체적으로, 본 발명의 상기 미세 패턴은 미세 패턴 내 배열된 복수의 미세 조절 패턴들에 의해서 나타나는 모양 또는 형상을 의미할 수 있다.

[0013] 상기 하나의 미세 패턴의 전체 면적은 500 내지 2000 μm^2 일 수 있고, 구체적으로, 상기 면적은 700~1500 μm^2 , 보다 구체적으로, 800 내지 1200 μm^2 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 상기 미세 패턴은 연꼴(kite) 모양, 삼각형 모양, 부채꼴 모양 및 물방울 모양 중에서 선택되는 하나의 모양을 갖는 형상을 나타낼 수 있고, 상기 모양들은 모두 도 1에 나타난 물방울 모양의 미세 패턴 형상과 같이, 예각을 갖는 하나의 말단을 갖고 상기 예각의 이등분선을 중심으로 위 아래로 대칭인 모양을 갖는다.

[0015] 본 발명에서 사용된 용어 “미세 조절 패턴”은 상기 미세 패턴의 전체 모양 및 형상을 디자인하는 모양들을 의미한다. 또한, 상기 미세 조절 패턴은 상기 하나의 미세 패턴이 어느 한 방향성을 나타내도록 조절할 수 있는 모양들을 의미할 수 있다.

[0016] 상기 미세 조절 패턴들은 크기 및 간격 조절이 가능한 일정한 면을 가진 모양이면 제한없이 사용될 수 있으며, 구체적으로, 점, 원형, 삼각형, 사각형, 오각형 등과 같은 다각형이 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 미세 조절 패턴들은 다양한 크기의 원모양일 수 있다.

[0017] 본 발명에서 사용된 용어 “방향성”은 본 발명의 상기 미세 패턴의 형상 자체 및/또는 상기 미세 패턴 내에 배열된 미세 조절 패턴의 배열에 의해서 어느 한 쪽으로 쏠려 있는 것을 의미할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 상기 용어 “방향성”은 “쏠림”과 교환적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 미세 패턴 내 복수의 미세 조절 패턴들이 미세 패턴의 전체 형상의 한 쪽 말단에 다른 쪽 말단과 비교하여 상대적으로 밀집되어 있을 때, “미세 조절 패턴이 밀집된 말단으로의 방향성을 가진다”, 또는 “미세 조절 패턴이 밀집된 말단으로 쏠려 있다”고 표현할 수 있다.

[0018] 본 발명의 상기 방향성은 상기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단으로의 방향성은 미세 패턴 내에 배열된 상기 미세 조절 패턴들의 크기 및/또는 상기 미세 조절 패턴들 사이의 간격(gap)의 변화를 통해 나타낼 수 있다.

[0019] 구체적인 일 실시예에서, 상기 방향성은 상기 미세 조절 패턴들의 그 크기가 상기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단 방향으로 갈수록 점점 작아지거나 커지도록 배열됨으로써 나타낼 수 있다.

[0020] 구체적인 다른 일 실시예에서, 상기 방향성은 상기 미세 패턴 내 배열된 상기 미세 조절 패턴들간의 간격이 상

기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단 방향으로 갈수록 점점 작아지거나 커지도록 배열됨으로써 나타날 수 있다.

- [0021] 구체적이고 다른 일 실시예에서, 상기 방향성은 상기 미세 조절 패턴들의 크기 및 상기 미세 조절 패턴들 사이의 간격이 각각 상기 미세 패턴의 어느 한쪽 말단 방향으로 갈수록 점점 작아지거나 커지도록 배열됨으로써 나타날 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명에서 상기 미세 패턴 자체의 방향성이 전방을 향한다고 가정할 때, 상기 미세 패턴 내 배열된 미세 조절 패턴의 방향성도 미세 패턴의 방향성과 같은 전방일 때, “전방 쏠림 패턴 (Cooperative micropattern)” 이라고 지칭할 수 있다. 이와 반대로, 상기 미세 패턴 내 배열된 미세 조절 패턴의 방향성이 후방으로 미세 패턴의 방향과 반대일 때, 후방 쏠림 패턴 (Competitive micropattern)으로 지칭할 수 있다.
- [0023] 구체적인 일 실시예에서, 도 1와 같이, 물방울 모양의 뾰족한 말단에서 둥근 말단까지 원형의 미세 조절 패턴들 간의 간격은 일정하게 점점 작아지고 미세 조절 패턴의 크기는 $1\mu\text{m}^2$ 에서 $5\mu\text{m}^2$ 으로 일정하게 점점 커질 때, 전방 쏠림 패턴 (Cooperative micropattern)에 해당하며, 반대로 원형의 미세 조절 패턴들 간의 간격은 점점 커지고 미세 조절 패턴의 크기는 $5\mu\text{m}^2$ 에서 $1\mu\text{m}^2$ 으로 일정하게 점점 작아질 때, 후방 쏠림 패턴 (Competitive micropattern)에 해당한다.
- [0024] 구체적인 다른 일 실시예에서, 도 2에 나타낸 바와 같이, 물방울 모양의 뾰족한 말단에서 둥근 말단까지 미세 패턴 내 원형의 미세 조절 패턴이 $1\mu\text{m}^2$ 에서 $5\mu\text{m}^2$ 으로 일정한 간격으로 점점 커지는 모양을 가질 때, 전방 쏠림 패턴 (Cooperative micropattern)에 해당하며, 반대로 미세 조절 패턴이 $5\mu\text{m}^2$ 에서 $1\mu\text{m}^2$ 으로 일정한 간격으로 점점 작아지는 모양을 가질 때, 후방 쏠림 패턴 (Competitive micropattern)에 해당한다.
- [0025] 구체적인 또 다른 일 실시예에서, 도 2와 같이, 물방울 모양의 뾰족한 말단에서 둥근 말단까지 미세 패턴 내 일정한 크기의 원형의 미세 조절 패턴들 간의 간격이 $5\mu\text{m}^2$ 에서 $1\mu\text{m}^2$ 으로 일정한 간격으로 점점 작아질 때, 전방 쏠림 패턴 (Cooperative micropattern)에 해당하며, 반대로 일정한 크기의 원형의 미세 조절 패턴들 간의 간격이 $1\mu\text{m}^2$ 에서 $5\mu\text{m}^2$ 으로 점점 커질 때, 후방 쏠림 패턴 (Competitive micropattern)에 해당한다.
- [0026] 상술한 바와 같이, 일정한 방향성을 가지도록 기관에 패터닝된 미세 조절 패턴들은 세포와의 부착성을 위해 세포 외 기질(Extracellular matrix, ECM) 단백질로 상기 디자인으로 패터닝될 수 있다. 여기서, 상기 세포 외 기질 단백질은 바람직하게는 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen), 라미닌(laminin), 젤라틴(gelatin) 및 폴리-D-라이신(PDL)로부터 선택되는 것 일 수 있다.
- [0027] 상기 미세 조절 패턴은 서로 다른 농도의 세포 외 기질 단백질로 전사되어 패터닝될 수 있다. 따라서 미세 조절 패턴들의 세포 외 기질 단백질의 농도 구배는 미세 조절 패턴의 크기 및 배열 이외에 추가적인 방향성을 제공할 수 있다. 예를 들면, 물방울 모양의 미세 패턴에서 후방에서 전방으로 갈수록 보다 고농도의 세포 외 기질 단백질로 미세 조절 패턴이 전사됨으로써 방향성을 제공할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 기관에 방향성을 나타내도록 세포 외 기질 단백질로 전사된 미세 패턴 및/또는 미세 조절 패턴은 상기 기관 상에 놓인 세포들의 분극화를 유도하여 세포를 기관 상에서 이동시킬 수 있다.
- [0029] 구체적으로, 세포는 기관 상의 미세 조절 패턴에 의해 형성된 방향성대로, 즉, 쏠림이 형성된 방향으로 세포 내 중심체가 이동하게 되고, 이에 따라 세포 분극화가 유도되어 그 방향으로 이동할 수 있다. 따라서, 전방 쏠림 패턴에서 세포는 전방으로 이동하며, 후방 쏠림 패턴에서 세포는 후방으로 이동한다.
- [0030] 이에 따라, 본 발명은 상술한 미세 패턴이 전사된 기관 또는 이를 포함하는 세포 배양 플랫폼에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포의 이동을 제어하는 방법을 제공한다.
- [0031] 또한 본 발명은 상술한 미세 패턴이 전사된 기관 또는 이를 포함하는 세포 배양 플랫폼에서 세포를 배양하는 단계; 및 상기 기관에서 상기 세포의 이동 정도를 평가하는 단계;를 포함하는 세포의 노화 정도를 평가하는 방법을 제공한다.
- [0032] 상기 세포의 노화 정도를 평가하는 방법은 노화된 세포의 경우, 상기 기관 상에서 세포 외 기질 단백질과의 부착성이 약해져 이동 속도 및/또는 이동 거리 등이 정상 세포와 비교하여 현저히 감소하는 특성을 이용한 것이다.

발명의 효과

[0033] 화학 자극에 의한 방법 (chemotaxis) 또는 세포 부착면의 물성을 조절하는 방법 (durotaxis)을 통한 세포의 선택적 이동을 유도하는 기존의 원리 대신 세포의 선택적 부착을 가능하게 하는 세포외기질 단백질의 미세패터닝 방법을 이용하여 세포가 특정 방향으로 극성을 띠도록 (cell polarization) 유도하였다. 본 발명의 장점은 첫째, 세포외기질 단백질의 패터닝 방법은 물방울, 삼각형, 화살표와 같이 단순하게 디자인된 미세패턴을 기관에 전사함으로써 기존의 방법에 비해 대량 균질 생산이 가능하다. 둘째, 본 발명을 통해 세포를 원하는 모양으로 배양할 수 있으며, 단일 모양 내에서 미세미터 단위의 미세 패턴의 크기, 위치와 같은 디자인 변경을 통해 세포 소기관들의 형성 조절이 가능하고 이를 통해 특정 방향으로의 세포의 이동을 유도할 수 있다. 셋째, 단일 패턴 내 미세미터 단위의 미세 패턴 디자인은 제한이 없으며, 세포의 종류, 크기, 기능에 적합한 디자인 구성이 가능하다. 넷째, 미세미터 단위의 미세 패턴 디자인의 어레이를 통해 연속적인 세포의 극성 유도가 가능하고 이를 통해 세포 이동을 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 미세 조절 패턴 디자인 및 피브로넥틴 프린팅을 나타낸 것으로, a는 단일 미세 패턴이고, b는 단일 미세 패턴 내 미세 조절 패턴들의 간격 및 크기 조절을 통한 전방 쏠림 패턴 및 후방 쏠림 패턴이다.

도 2는 단일 미세 패턴 내 미세 조절 패턴들의 크기 조절만을 통한 전방 쏠림 패턴 및 후방 쏠림 패턴 및 이를 이용한 세포의 이동 제어 결과이다.

도 3은 미세 패턴이 패터닝된 기관을 포함하는 세포배양 플랫폼의 제작방법을 도식화한 것이다.

도 4는 단일 미세 패턴 내 미세 조절 패턴에 따른 세포 부착 및 극성 관련 단백질의 분포 변화를 나타낸 것이다.

도 5는 연속적으로 이어진 미세 조절 패턴에서의 세포의 이동 및 세포 이동 관련 단백질의 활성도를 나타낸 것이다.

도 6은 미세패터닝된 세포 배양 플랫폼을 이용하여 세포 노화에 따른 세포 분극화 변화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 실시예 1. 세포 분극을 유도할 수 있는 미세 패턴 디자인 및 제조

[0036] 한 방향으로 이동하는 세포가 나타내는 분극화된 세포 (polarized cell)의 형태를 유도하기 위해 세포 부착이 용이한 세포외기질 단백질 (extracellular matrix, 예를 들어, fibronectin)을 분극화된 세포 모양으로 미세 패터닝한다. 이를 위해 PDMS (Polydimethylsiloxane) 고분자 중합체를 이용하여 미세패턴을 전사할 수 있는 스탬프 (stamp)를 제작한다. 기존의 세포의 극성을 조절하기 위한 미세 패턴 모델은 단일한 형태의 물방울이나 화살표 모양으로 제작되어 세포 소기관의 형성을 조절할 수 없었으며, 미세 패턴의 모양 변경이 세포의 반응 및 이동을 유도할 수 있는 유일한 수단이었다 (도 1a). 반면, 미세 패턴을 포함한 미세 패턴은 단일한 형태의 미세 패턴 내에 미세 조절 패턴들의 다양한 크기, 위치(간격) 제어로 변화를 주어 세포 부착 및 세포 소기관의 형성 변화를 유도할 수 있도록 제작하였다 (도 1b).

[0037] 전체 미세 패턴은 $1000\mu\text{m}^2$ 의 물방울 모양으로 구성하였다. 미세 패턴 내 미세 조절 패턴은 전방 쏠림 패턴 (Cooperative micropattern)은 전방을 기준으로 미세 조절 패턴이 $5\mu\text{m}^2$ 에서 $1\mu\text{m}^2$ 으로 일정한 간격으로 점점 작아지는 모양을 가지는 동시에 미세 조절 패턴들간의 간격은 점점 넓어지며, 후방 쏠림 패턴 (Competitive micropattern)은 후방을 기준으로 $5\mu\text{m}^2$ 에서 $1\mu\text{m}^2$ 으로 작아지는 모양을 가지는 동시에 미세 조절 패턴들간의 간격은 점점 넓어지도록 디자인하였다 (도 1b). 이러한 미세 조절 패턴의 크기 및 간격의 변화를 통해 세포의 극성 및 분극화를 유도할 수 있다.

[0038] 또한, 미세 조절 패턴의 크기 변화만에 의한 효과를 확인하기 위해, 미세 패턴 내 미세 조절 패턴은 전방 쏠림 패턴 (Cooperative micropattern)은 전방을 기준으로 미세 조절 패턴이 $5\mu\text{m}^2$ 에서 $1\mu\text{m}^2$ 으로 일정한 간격으로 점점 작아지는 모양을 가지며, 후방 쏠림 패턴 (Competitive micropattern)은 후방을 기준으로 $5\mu\text{m}^2$ 에서 $1\mu\text{m}^2$ 으로 작아지는 모양을 가지도록 디자인하였다 (도 2a). 그 결과, 이러한 미세 조절 패턴의 크기만의 변화를 통

해 세포의 극성 및 분극화를 유도할 수 있음을 확인하였다(도 2b, 2c, 2d)

[0039] 미세 조절 미세패턴 세포 배양 플랫폼은 다음과 같은 순서로 제작되었다. 실리콘 웨이퍼 위에 포토레지스트를 부은 후 스핀코팅을 이용해 1 μ m의 두께의 얇은 포토레지스트 막을 만든다. 미세 조절 패턴으로 디자인된 크롬 포토마스크를 실리콘 웨이퍼 위에 두고 UV를 조사하여 원하는 패턴에 맞춰 포토레지스트를 경화시키고 경화되지 않은 부분을 제거한다. 제작된 미세 패턴이 그려진 실리콘 웨이퍼에 PDMS prepolymer를 부은 후 오븐에서 경화시켜 음각 형태의 미세 패턴 PDMS를 만든다. 양각 형태의 미세 패턴 PDMS를 제작하기 위해 음각 미세 패턴 PDMS에 계면활성제인 플루오닉 F-127 (PF127)을 부어 미세 패턴 PDMS에 계면활성제 층을 만든다. 그 위에 PDMS prepolymer를 부은 후 오븐에서 경화시켜 양각 형태의 미세 조절 미세패턴 PDMS를 만든다. 미세 조절 미세 패턴 PDMS 위에 세포외기질 단백질인 피브로넥틴을 올려 코팅한 후 산소 플라즈마 처리가 된 유리기관 위에 부착시켜 피브로넥틴을 미세패턴 모양으로 유리기관 위에 코팅한다. 피브로넥틴이 코팅된 부분을 제외한 나머지 부분에 세포가 부착할 수 없도록 패시베이션하여 미세패턴 모양으로만 세포가 부착할 수 있는 배양 플랫폼을 제작하였다 (도 3).

[0041] 실시예 2. 세포의 분극 제어

[0042] 단일 미세 패턴 내 미세 조절 패턴을 이용해 세포의 극성이 조절될 수 있음을 증명하기 위해 물방울 모양을 가지는 미세 패턴을 제작하였고 세포 배양을 하여 세포의 극성과 관련된 단백질의 분포를 이미징을 통해 나타내었다. 먼저, 세가지 형태의 물방울 모양 미세 패턴을 가지는 세포 배양 플레이트에 세포를 총 6시간 동안 배양하여 세포가 미세패턴 위에서 충분히 부착될 수 있도록 하였다. 배양 후 paraformaldehyde를 이용하여 세포를 고정하고 면역형광법 (Immunofluorescence Staining)을 이용해 세포의 접착 및 극성에 관련하는 단백질을 염색하였다. 균일한 미세 패턴에서는 세포의 부착과 관련된 단백질인 vinculin의 분포가 패턴의 전후방 끝에서 모두 나타나지만, 단일 미세 패턴 내 미세 조절 패턴에서는 미세 패턴의 쏠림 방향에 따라 부착 관련 단백질이 다르게 형성되는 것으로 보인다 (도 4a). 세포의 극성을 나타내는 단백질인 MTOC (Microtubule organization center)의 위치를 세포핵과 비교하여 분석하였을 때 전방 쏠림 미세 패턴에서는 MTOC의 위치가 우측에 형성되고 이와 반대로 후방 쏠림 미세 패턴에서는 MTOC의 위치가 좌측에 형성함을 확인할 수 있다 (도 4b). 세포막 움직임을 통해 세포의 이동에 관여하는 단백질 CDC42의 활성 정도도 단일 패턴 내 미세 패턴의 쏠림 형태에 따라 형성되는 위치가 달라짐을 보인다. 전방 쏠림 미세 패턴에서는 미세패턴 전방에서 CDC42가 강한 활성을 나타내는 한편, 후방 쏠림 미세 패턴에서는 후방에서 강한 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있다 (도 4c).

[0044] 실시예 3. 특정 방향으로의 세포 이동 유도

[0045] 단일 미세 패턴 내 미세 패턴 조절에 따른 세포 이동 실험을 실시하였다. 쥐의 섬유아세포를 이용하여 연속적으로 연결되어 있는 미세 패턴 위에서의 세포 이동을 실시간으로 관찰하였다. 미세 패턴 내 미세 패턴의 방향에 따라 세포의 이동성이 큰 차이를 보였다 (도 5a). 전방 쏠림 패턴에서 70% 이상의 세포는 미세 패턴의 전방을 향한 방향으로 이동한 반면, 후방 쏠림 패턴에서는 미세 패턴의 후방을 향한 방향으로 세포가 이동한 것을 확인할 수 있었다. 이는 CDC42 활성을 실시간으로 확인하였을 때도 비슷한 결과가 나타났다. 전방 쏠림 패턴과 후방 쏠림 패턴 모두에서 세포가 이동하는 방향에서 CDC42 활성이 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있다 (도 5b). 이를 통해 세포의 이동이 단일 미세패턴의 모양에 의해서 결정되는 것이 아니라 미세 패턴 내의 미세 패턴 조절에 따른 세포소기관의 활성 변화에 따라 달라짐을 알 수 있다(도 5).

[0047] 실시예 4. 세포 노화 정도에 따른 세포 이동 분석

[0048] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조한 패턴된 세포 배양 플랫폼의 인간 세포 노화에 따른 개별 세포 수준의 기능 저하 정도(세포 분극 정도 감소)를 검증하는데 활용 가능성을 확인하기 위하여 정상 세포에 상응하는 어린 사람(3세)에서 추출한 체세포((Human dermal fibroblast) 및 노화 세포에 상응하는 노인 사람(92세)에서 추출한 체세포를 사용하여 상기 플랫폼에서 세포 배양함으로써 세포의 분극(이동)을 상기와 동일한 방식으로 확인하였다.

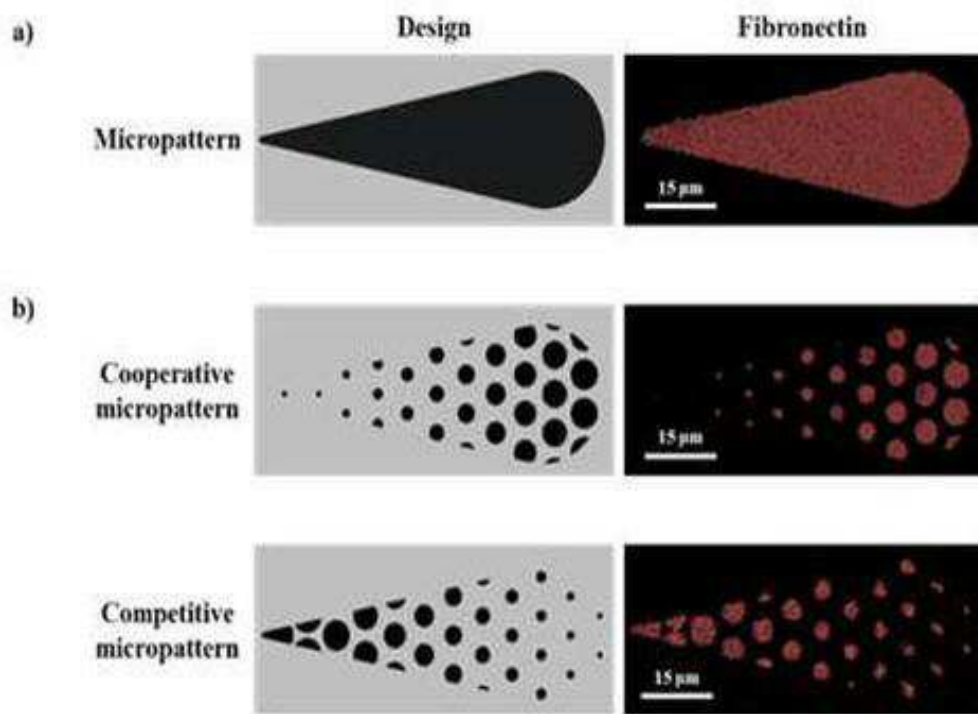
[0049] 그 결과, 도 6에 나타나는 바와 같이, (좌) Cooperative pattern 에서 정상세포 (3세에서 추출한 세포)는 미세 패턴의 오른쪽으로 세포 분극이 일어나 양의 EOP 값을 나타내지만, 노화 세포(92세에서 추출한 세포)는 동일한

패턴에서 배양함에도 세포 분극이 약화되어, 0에 근접한 EOP 값을 나타냄을 확인하였다. 또한, (우) Competitive pattern 에서 정상 세포 (3세에서 추출한 세포)는 미세패턴의 좌측으로 세포 분극이 일어나 음의 EOP 값을 나타내지만, 노화 세포 (92세에서 추출한 세포)는 동일한 패턴에서 배양함에도 세포 분극이 약화되어, 0에 근접한 EOP 값을 나타냄을 확인하였다.

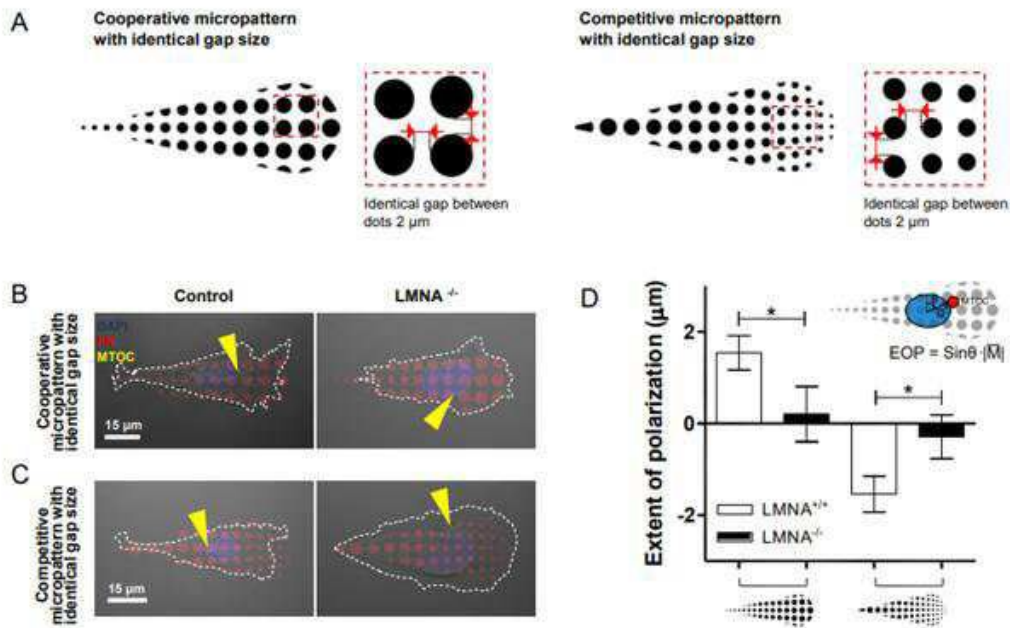
[0050] 따라서, 본 발명의 패터닝된 세포 배양 플랫폼을 이용하여 세포의 분극화 정도를 비교함으로써 세포 노화 정도를 평가할 수 있음을 확인하였고, 또한, 세포 노화를 억제하는 물질의 스크리닝에도 활용가능성을 확인하였다.

도면

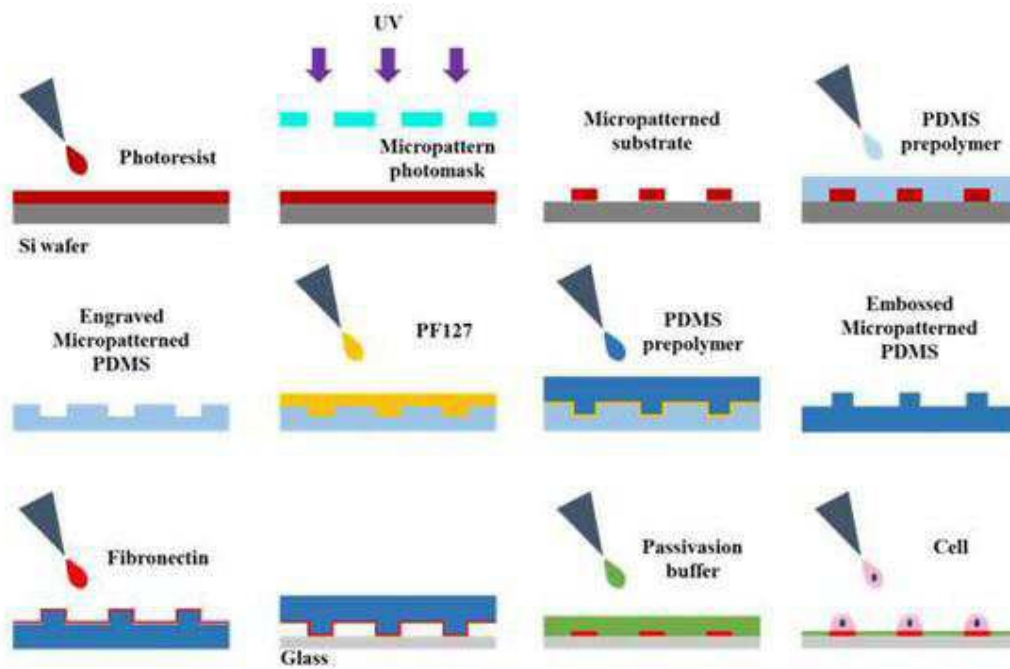
도면1



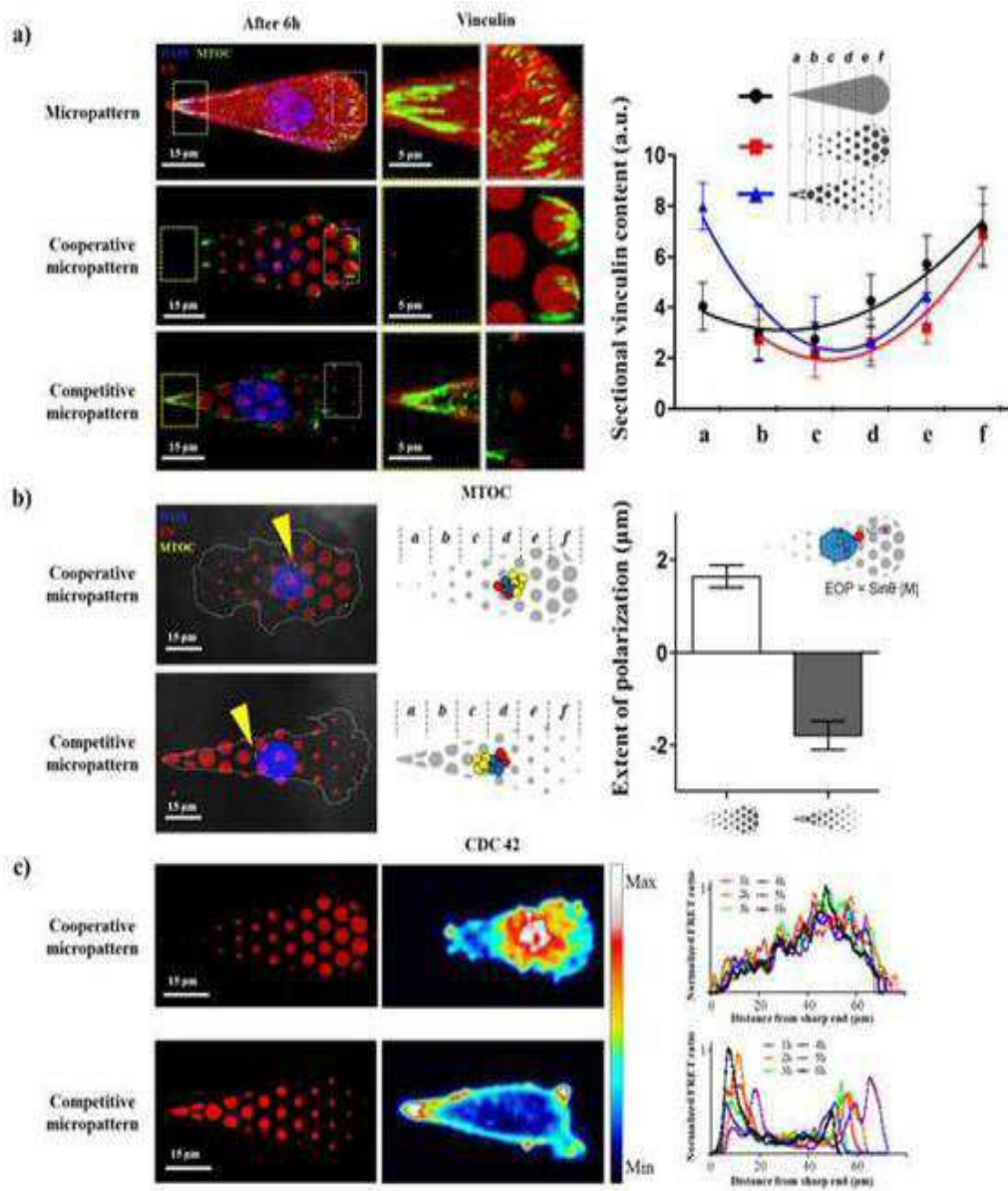
도면2



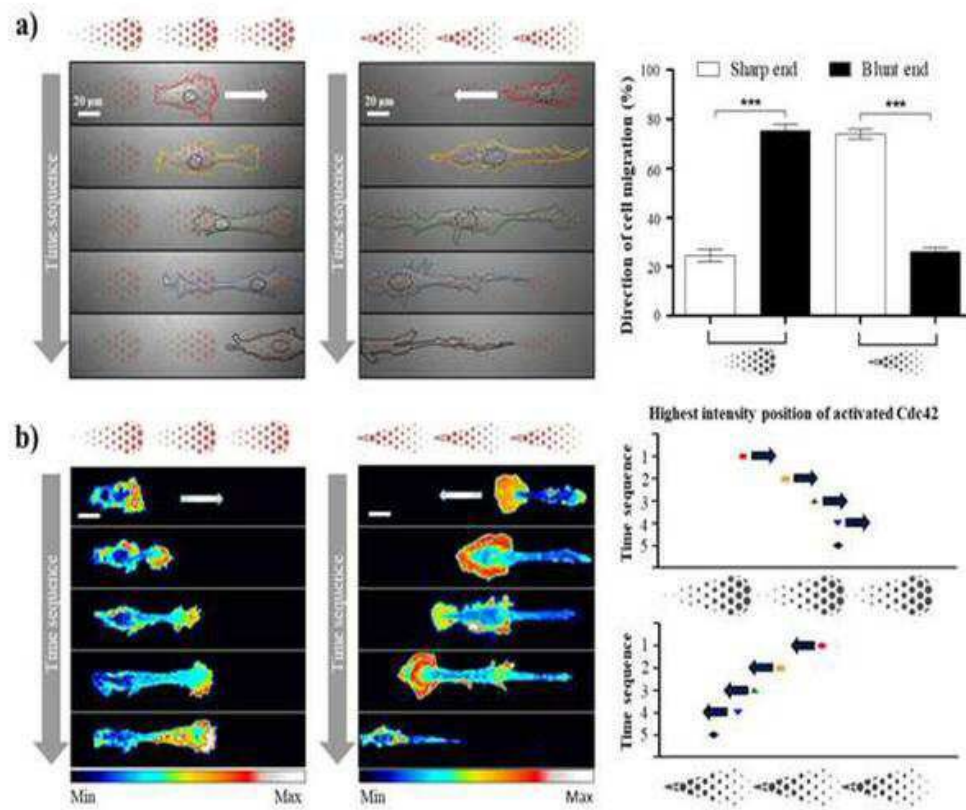
도면3



도면4



도면5



도면6

