(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0038855
(43) 공개일자 2023년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) *A61F 2/06* (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01) *A61L 27/56* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3675 (2013.01)
A61F 2/062 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0121452
(22) 출원일자 2021년09월13일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
김지원
인천광역시 연수구 신송로118번길 6, 106동 1401호(송도동, 송도풍림아이원1단지아파트)
최정석
인천광역시 연수구 해돋이로120번길 16, 207동 1401호(송도동, 송도풍림아이원2단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

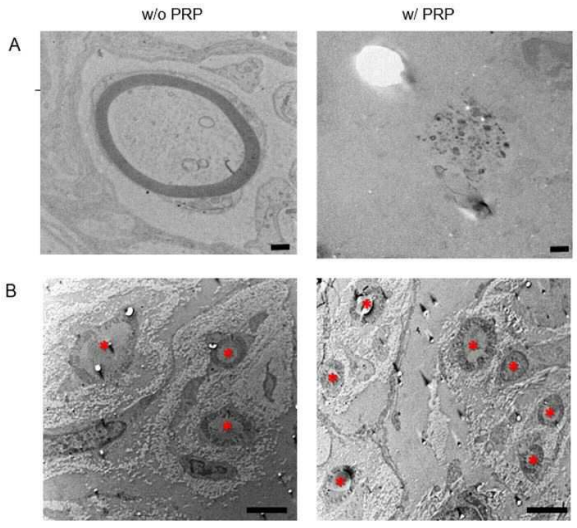
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관 및 이의 제조방법과 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 토끼의 왼쪽 후두신경 (RLN)을 절제한 후 삽입한 결과, 8, 12 및 16주에 후두신경을 따라 취한 세로 단면에서 NGC 내에서 점진적인 신경 성장이 확인되었으며, 이식 후 16주에 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관 처리군에서 재생된 신경의 중간 영역의 수초 섬유가 비 부하 NGC 그룹보다 더 풍부하고 축삭 섬유가 잘 조직화된 수초와 더 조밀한 것을 확인함에 따라, 상기 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관은 후두신경 재생용 조성물로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/3616 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 2300/802 (2013.01)
A61L 2430/32 (2013.01)
(72) 발명자
김정미
서울특별시 용산구 이촌로65가길 51, 214동 801호
(이촌동, 한가람아파트)

최미은
인천광역시 미추홀구 독정안길42번길 13-26, 가동 201호(숭의동, 대승우리빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711131211
과제번호 2019M3E5D1A02069612
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명 신경재생의 정합성 향상을 위한 혈소판 풍부혈장 탑재 신경도관 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교의과대학부속병원
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345320552
과제번호 2020R1I1A1A01067879
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 자가 혈소판 유래 베지클을 이용한 노화 및 항암치료 유발 타액선 기능저하 치료제 적용 연구
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711137725
과제번호 2021R1A5A2031612
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 세포교신 제어 연구센터
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345332055
과제번호 2020R1I1A1A01075043
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 Sodium-Iodide Symporter 제어를 통한 갑상선암 방사성요오드 치료 기인 침샘 손상 예방기술 개발
기 여 율 10/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

혈소판풍부혈장과 알지네이트 혼합물이 미세 다공성 도관 내부에 주입되고, 상기 도관 내부에서 혈소판풍부혈장과 알지네이트 혼합물이 겔화되는 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 혈소판풍부혈장은 혈소판 수가 4 ~ 5×10^{8}/mL로 포함되는 것을 특징으로 하는 신경유도도관.

청구항 3

혈소판풍부혈장과 알지네이트를 혼합하여 혈소판풍부혈장 혼합물을 준비는 단계(제1단계);

생체적합성 고분자과 플루로닉 (Pluronic) F127 혼합물을 압연(rolling)시킨 후 둥글게 말아 미세구멍이 형성된 다공성 도관을 제조하는 단계(제2단계); 및

상기 제1단계의 혈소판풍부혈장 혼합물을 제2단계의 다공성 도관 내부에 주입시켜 겔화시키는 단계(제3단계)를 포함하는 후두신경 재생용 신경유도도관 제조방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 다공성 도관은 생체적합성 고분자 90 내지 98 중량%와 플루로닉 (Pluronic) F127이 2 내지 10 중량% 로 이루어지는 것을 특징으로 하는 후두신경 재생용 신경유도도관 제조방법.

청구항 5

청구항 1의 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 유효성분으로 포함하는 후두신경 재생용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관 및 이의 제조방법과 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 신경손상 발생 시 환자로부터 획득한 조직을 이용해 손상부위에 자가이식(autograft)하는 시술이 이용되고 있으나 이는 조직을 획득한 부위에 또 다른 손상을 가하게 되며 조직의 양이 한정되어 있어 손상부위에 적합한 크기와 길이의 신경조직을 구하기 어렵다는 단점이 있다. 이를 극복하고자 동종이나 이종으로부터 신경조직을 획득하여 이식하는 동종이식(allograft)이나 이종이식(xenograft) 등이 제시되었으나 재료에 대한 환자의 면역반응을 유도하는 문제점이 존재한다. 따라서 천연 및 합성 고분자를 이용해 신경도관을 제작하여 신경손상부위에 적용하기 위한 연구가 진행되고 있다.

[0003] 기존의 신경도관은 도관 내부의 산소와 영양분 교환이 어렵기 때문에 재생조직의 생존과 증식에 영향을 미치므로 다공성 표면을 가지는 신경도관 제작 기술이 개발되고 있다. 하지만 기존의 신경도관은 재생조직의 보호 효과뿐만 아니라 재생을 향상시키는 효과를 얻기 위해 표면에 신경재생물질 또는 신경성장인자 등을 코팅하므로 공정이 복잡해지며 비용과 소요 시간이 증가하게 되는 문제점이 있다.

[0004] 또한, 종래의 신경도관은 용매 주조법(solvent casting)과 전기방사법 (electrospinning) 등을 사용해 다공성 표면을 가지는 도관을 제작하여 산소 및 영양분 교환을 도모하였지만, 기공의 크기와 간격을 조절하기 어려워 도관 내부에서 세포의 이동이 제한된다는 단점이 있어 이를 생체 내 이식할 경우, 신경재생 조직의 보호 효과외 재생향상 효과를 기대하기 어렵다.

[0005] 혈소판풍부혈장(PRP) 내의 혈소판은 혈관 내에 포함되어 있는 물질을 통하여 활성화되어, 성장물질(growth factor)과 다양한 활성물질(active substance)을 배출하게 되는데, 활성화시키는 물질로는 콜라겐, 트롬빈, adenosine diphoaphate (ADP)와 epinephirine이 있다. 특히 콜라겐과 트롬빈은 강한 작용물질(strong agonist)로 알려져 있는데, 콜라겐의 특이적인 서열이 혈소판과 부착시켜 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 활성인자에 의해 혈소판이 활성화되면 혈소판의 알파 그래뉼(alpha granules)의 탈과립(degranulation)으로 성장인자(growth factor)가 방출하여 초기 상처 치유(wound healing)에 중요한 역할을 하며, 이때 방출되는 성장인자(growth factor)로는 platelet derived growth factor (PDGF-AB), transforming growth factor-b1(TGF-b1), vescular endothelial growth factor(VEGF), epidermal growth factor(EGF)와 insulin-like growth factor(IGF)등이 있다. 또한 혈소판풍부혈장(PRP)는 생체 외 조건에서 싸이토카인 등을 방출하여 섬유아세포의 DNA를 합성하고, 콜라겐의 생성을 증가시켜, 콜라겐 구조를 조직화하게 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0106045호 (2015.09.21. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 혈소판풍부혈장겔이 내부에 포함된 신경유도도관을 제공하며, 상기 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 유효성분으로 포함하는 후두신경 재생용 조성물로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 혈소판풍부혈장과 알지네이트 혼합물이 미세 다공성 도관 내부에 주입되고, 상기 도관 내부에서 혈소판풍부혈장과 알지네이트 혼합물이 겔화되는 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 제공한다.

[0010] 본 발명은 혈소판풍부혈장과 알지네이트를 혼합하여 혈소판풍부혈장 혼합물을 준비는 단계(제1단계); 생체적합성 고분자과 플루로닉 (Pluronic) F127 혼합물을 압연(rolling)시킨 후 둥글게 말아 미세구멍이 형성된 다공성 도관을 제조하는 단계(제2단계); 및 상기 제1단계의 혈소판풍부혈장 혼합물을 제2단계의 다공성 도관 내부에 주입시켜 겔화시키는 단계(제3단계)를 포함하는 후두신경 재생용 신경유도도관 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 유효성분으로 포함하는 후두신경 재생용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 토끼의 왼쪽 후두신경 (RLN)을 절제한 후 삽입한 결과, 8, 12 및 16주에 후두신경을 따라 취한 세로 단면에서 NGC 내에서 점진적인 신경 성장이 확인되었으며, 이식 후 16주에 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관 처리군에서 재생된 신경의 중간 영역의 수초 섬유가비 부하 NGC 그룹보다 더 풍부하고 축삭 섬유가 잘 조직화된 수초와 더 조밀한 것을 확인함에 따라, 상기 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관은 후두신경 재생용 조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 혈소판풍부혈장이 포함된 신경 유도 도관 (nerve guidance conduits, NGCs) 제작 방법 및 상기 제작된 NGC를 토끼 재발성 후두신경 손상 모델에 삽입하여 신경재생을 유도하는 과정을 설명한 모식도이다.

도 2는 신경 유도 도관 내 혈소판풍부혈장(PRP) 겔 활성을 확인하기 위해 CD62P 발현 수준을 확인한 유세포 분석 결과 및 전체 단백질 함량 및 TGF-β1 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 3은 사람유래 슈반세포의 증식 및 이동에서 PRP의 효능을 확인한 결과이다.

도 4는 PRP 처리에 따른 슈반세포의 신경재생관련 단백질 발현 변화를 확인한 결과이다.

도 5는 토끼 재발성 후두신경 (RLN) 손상모델에서 PRP 함유 NGC 삽입에 따른 성대 움직임 변화를 확인한 결과이다.

도 6은 PRP 처리에 따른 성대 근육변화 및 재생된 신경조직의 신경 마커 발현을 확인한 톨루이딘 블루 염색 및 면역조직화학염색 결과이다.

도 7은 PRP 처리 후 재생된 신경조직을 확인한 TEM 이미지 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 혈소판풍부혈장과 알지네이트 혼합물이 미세 다공성 도관 내부에 주입되고, 상기 도관 내부에서 혈소판풍부혈장과 알지네이트 혼합물이 겔화되는 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 제공할 수 있다.

[0017] 상기 혈소판풍부혈장은 혈소판 수가 4 ~ 5×10^8/mL로 포함되는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명은 혈소판풍부혈장과 알지네이트를 혼합하여 혈소판풍부혈장 혼합물을 준비는 단계(제1단계); 생체적합성 고분자과 플루로닉 (Pluronic) F127 혼합물을 압연(rolling)시킨 후 둥글게 말아 미세구멍이 형성된 다공성 도관을 제조하는 단계(제2단계); 및 상기 제1단계의 혈소판풍부혈장 혼합물을 제2단계의 다공성 도관 내부에 주입시켜 겔화시키는 단계(제3단계)를 포함하는 후두신경 재생용 신경유도도관 제조방법을 제공할 수 있다.

[0019] 상기 혈소판풍부혈장은 혈소판 수가 4 ~ 5×10^8/mL로 포함되는 것일 수 있다.

[0020] 상기 다공성 도관은 생체적합성 고분자 90 내지 98 중량%와 플루로닉 (Pluronic) F127이 2 내지 10 중량%로 이루어지는 것일 수 있다.

[0021] 상기 생체적합성 고분자는 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 폴리엘-락트산(PLLA), 폴리락트산-글리콜산 공중합체(PLGA), 폴리락트산-카프로락톤 공중합체(PLCL), 생분해성 폴리카보네이트(biodegradable polycarbonate) 및 이들의 공중합체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0022] 상기 겔화시키는 단계는 다공성 도관 내부에 담겨있는 $CaCl_2$에 의해 혈소판풍부혈장 혼합물이 겔화되는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명은 혈소판풍부혈장을 함유하는 신경유도도관을 유효성분으로 포함하는 후두신경 재생용 조성물을 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명의 실시예에 따르면 토끼의 오른쪽 후두 신경(RLN)은 정상 대조군으로 보존되었지만 왼쪽 RLN은 절제되어 신경유도도관(NGC)이 삽입되었다 (도 1E). 보다 상세하게 수술 전 동물은 5 mg/kg의 자일라진(xylazine)을 피하로 마취하고 수술 직전에 15 mg/kg의 졸라제팜(zolazepam)을 근육 주사하였다. 각각의 경우, 경추 수직 절개를 사용하여 왼쪽 RLN을 노출시킨 다음 원주 방향으로 10mm 길이로 절개하였다 (도 1F 및 G). NGC는 근위 및 원위 신경 종말 사이에 삽입한 뒤 접합 봉합사(7-0 Vicryl; Ethicon, Somerville, NJ)를 사용하여 부착하였다. 10마리의 토끼는 무부하 NGC 튜브를 삽입하였고, 12마리의 토끼는 PRP 로딩된 NGC 튜브를 삽입하였으며, 이식 후, 스트랩 근육은 4-0 Vicryl로, 피부는 3-0 Ethilon(Ethicon, Somerville, NJ)으로 각각 봉합하였다.

[0025] 이후 성대 근육 단면에서 결정된 근육 두께를 비교하였다. 그 결과, 도 5C와 같이 이식 후 16주에 PRP 부하 NGC 그룹에서 오른쪽 및 왼쪽 성대 근육의 축 방향 섹션은 유사했지만 부하가 없는 NGC 그룹에서 왼쪽 성대 근육이 위축됨을 확인하였다. 또한, 도 5D와 같이 성대 근육 면적 비율은 PRP가 부하 NGC 그룹(89.34 ± 6.23%)이 부하되지 않은 NGC 그룹(83.20 ± 6.31%)보다 유의하게 더 높은 것으로 나타났다 ($P = 0.033$).

[0026] 또한, 도 6A와 같이 이식 후 8, 12 및 16주에 RLN을 따라 취한 세로 단면은 NGC 내에서 점진적인 신경 성장을 보여주었으며, 이식 후 8주에 PRP 군에서는 신경 절단에서 유래하는 짧은 구조적 분절이 관찰되었지만 부하되지 않은 PRP NGC 군에서는 관찰되지 않았으며, PRP 부하 NGC 그룹에서는 16주차에 양쪽 절단에 부착된 긴 연결된 신경이 확인되었다. 톨루이딘 블루 염색 결과에서도 도 6B와 같이 PRP가 장착된 NGC 튜브의 종단면에서 16주차에 두 신경 말단 사이의 연결이 확인됨에 따라, 면역조직화학염색분석으로 신진 구조가 신경 조직인지 여부를

확인하였다.

[0027] 흥미롭게도, 도 6C와 같이 이식 후 16주에 NF, S100 및 Ach esterase는 PRP 부하 NGC 그룹의 연결된 신경 조직에서 강하게 발현되었지만 부하가 없는 NGC 그룹에서는 거의 검출되지 않았다. 또한, 16주에 PRP 부하 NGC 그룹에서 재생된 신경의 중간 영역의 TEM 이미지(도 7B)에서 수초 섬유가 비 부하 NGC 그룹보다 더 풍부하고 축삭 섬유가 잘 조직화된 수초와 더 조밀한 것을 확인할 수 있었다 (그림 7A).

[0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0031] <실험예>

[0032] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0034] 1. 혈소판겔 제조 및 특성분석

[0035] 호흡마취한 랫트의 심장에서 2.2% sodium citrate (1:9, v/v) 이 담긴 일회용 주사기를 이용하여 전혈을 채취한 뒤, 1500 rpm에서 10분동안 원심분리하여 혈소판풍부혈장을 얻고, 3000 rpm에서 20분동안 원심분리하여 혈소판 제거혈장을 분리하였다. 혈소판 수를 4~4.5×10^8 /mL 로 조정한 혈소판풍부혈장을 37 ℃, 1100 rpm에서 3분간 미리 배양한 다음, 10 μg/ml의 콜라겐을 처리하고 37 ℃, 1100 rpm에서 20분간 배양하여 혈소판을 활성화시킨 후 4℃, 1500 g에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 얻었다. 혈소판의 활성화도는 CD62P (혈소판 활성화 마커)의 발현변화를 유세포분석기 (Beckman Coulter, USA)를 이용하여 측정하였다. 얻어진 상등액은 3 kDa MWCO centrifugal filter unit을 사용하여 농축시킨 후, 총 단백질양은 BCA protein assay 로 측정하였고, transforming growth factors-beta (TGF-β) 정량을 위해 사용직전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0037] 2. 신경 유도 도관 (nerve guidance conduits, NGCs) 준비

[0038] PCL/Pluronic F127 시트는 침지 침전법을 사용하여 제조되었으며 NGC는 이전에 보고한 압연(Oh, S. H. *et al. Tissue Engineering Part C: Methods* **19**, 233-243, 2013.)에 의해 만들었다. 요약하면, 비대칭 다공성 시트(양면에 나노 및 미세 기공)를 만들기 위해 PCL 펠릿을 90℃에서 테트라글리콜(10 wt%; Sigma Aldrich, St Louis, MO)으로 용해한 다음 만들어진 PCL 용액(5 wt%, PCL 베이스)에 Pluronic F127 분말(BASF, Ludwigshafen, Germany)을 첨가하였다. PCL/F127을 50 mm × 50 mm × 0.4 mm 크기로 성형하여 상온에서 1시간 동안 침지하였고, 침전된 PCL/F127 시트를 세척한 후 진공 건조하였다. 1 mm 직경의 금속 맨드릴(튜브 내부, 나노포어 측)을 사용하여 시트를 튜브로 말고, 시트의 가장자리를 조직 접착제(히스토아크릴; B. Braun, Melsungen, Germany)를 사용하여 고정하였으며, 제조된 비대칭 다공성 NGC의 내경은 1 mm이고 길이는 10 mm였다.

[0040] 3. NGC에서 PRP 알지네이트 혼합물의 제조

[0041] PRP 알지네이트 혼합물은 내부 겔화 공정을 통해 제조되었다. 요약하면, PRP를 갈조류 유래 알긴산 나트륨염(Sigma, Medium Viscosity)으로 만든 2 % 알지네이트 용액과 혼합한 다음 혼합물을 6 % $CaCl_2$(Sigma) 이 담겨있는 NGC 튜브 내부에 주사기 바늘(26½ 게이지)을 이용하여 분배하였다. PRP와 알지네이트 혼합물은 Ca^{2+} 이온이 고분자 혼합물로 확산되어 견고하게 겔화되므로, 일차적으로 겔화된 PRP 혼합물을 $CaCl_2$ 용액에서 20분 동안 인큐베이션하여 겔화 과정을 완료하였다.

[0043] 4. In vitro 재생 연구

[0044] 4-1. 사람유래 슈반세포 배양

[0045] 사람유래 슈반세포는 ScienCell Research Laboratories(카탈로그 번호 1700; Carlsbad, CA)에서 구입하였고, 폴리-L-라이신(2 μg /cm^2) 코팅된 배양 접시에서 배양하였다. 배지는 3일에 한번씩 교환하였으며 90% 이하의 밀집도를 유지하면서 계대배양하였다.

[0047] 4-2. 세포증식능 확인

[0048] 슈반세포를 96-웰 플레이트에 웰당 1 × 10^4개 세포로 분주하고 0%, 5% 또는 10% 농도의 PRP가 포함된 배양 배지에서 배양하였다. 세포 증식은 배양 1일 및 3일에 Cell Counting Kit-8 assay(CCK-8, Dojindo, Japan)를 사용하여 평가하였다. 10 μL의 CCK-8 시약을 배지 100uL에 첨가하고 37 ℃에서 3시간 동안 배양한 후, 웰 플레이트 판독기(Dynex Revelation, Dynex Ltd, UK)를 사용하여 450 nm에서 포르마잔 흡광도를 측정하였다.

[0050] 4-3. 세포 이동 및 상처 치유 분석

[0051] 세포 이동은 트랜스웰 분석(Corning Inc, Corning, NY) 및 상처 치유 분석을 사용하여 평가하였다. 트랜스웰 분석을 위해 SC를 배양 배지의 상부 챔버에 배양하고 다른 농도(0%, 5% 또는 10%)의 PRP 겔을 하부 챔버에 첨가하였다. 4시간 및 8시간 후, 면봉을 사용하여 막 상부 표면의 이동되지 않은 세포를 제거하고 하부 표면의 이동 SC를 메탄올로 고정한 뒤, 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. 그런 다음 이동된 세포를 이미지화하고 현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 계수하였으며, 이동된 세포 수는 이동된 비처리 대조군의 백분율로 표시하였다. 상처 치유 분석을 위해 슈반세포는 세포배양접시에 100% 밀집도를 보일때까지 성장시킨 다음, 멸균 100 μL 피펫 팁을 사용하여 '상처'하고 0, 5 및 10%의 PRP 겔을 처리하였다. 4시간 및 8시간 후 상처 부위로의 이동 속도를 도립 현미경(Olympus, Japan)을 사용하여 측정하였으며, 이동 영역은 PRP 처리되지 않은 대조군의 영역에 대한 백분율로 표시하였다.

[0053] 4-4. 단백질 발현

[0054] 0, 5 및 10% 농도에서 PRP로 처리된 사람유래 슈반세포의 단백질 발현 변화를 평가하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 사용된 1차 항체는 수초 관련 당단백질(MAG, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 수초 염기성 단백질(MBP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 뉴로트로핀-3(NT-3, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 신경 성장 인자(NGF, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 및 세포외 신호 조절 키나제(ERK, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). GAPDH(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 내부 대조군으로 사용하였다. 정량 분석은 ImageJ 소프트웨어(버전 1.49; Wayne Rasband, National Institutes of Health)를 사용하여 수행하였다. 쥐 PRP에 NGF의 발현을 배제하고 사람유래 슈반세포에서 분비되는 NGF 농도를 측정하기 위하여, 사람 NGF ELISA (Abnova, Taipei, Taiwan)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 측정하였다.

[0056] 5. in vivo 신경 재생 연구

[0057] 5-1. 토끼 재발성 후두신경 (RLN) 손상 모델

[0058] 본 연구는 인하대학교병원 동물윤리위원회(INHA 18 0503-560)의 승인을 받았으며, 동물보호 및 실험은 동물윤리위원회 규정에 따라 수행되었다. 22 마리의 암컷 뉴질랜드 흰 토끼를 무작위로 NGC 비 부하 그룹(n = 10) 또는 PRP 부하 NGC 튜브 그룹(n = 12)에 할당하였다. 토끼의 오른쪽 RLN은 정상 대조군으로 보존되었지만 왼쪽 RLN은 절제되어 NGC로 삽입시켰다 (도 1E). 수술 전 동물은 5 mg/kg의 자일라진(xylazine)을 피하로 마취하고 수술 직전에 15 mg/kg의 졸라제팜 (zolazepam)을 근육 주사하였다. 각각의 경우, 경추 수직 절개를 사용하여 왼쪽 RLN을 노출시킨 다음 원주 방향으로 10mm 길이로 절개하였다 (도 1F 및 G). NGC는 근위 및 원위 신경 종말 사이에 삽입한 뒤 접합 봉합사(7-0 Vicryl; Ethicon, Somerville, NJ)를 사용하여 부착하였다. 10마리의 토끼는 무부하 NGC 튜브를 삽입하였고, 12마리의 토끼는 PRP 로딩된 NGC 튜브를 삽입하였으며, 이식 후, 스트랩 근육은 4-0 Vicryl로, 피부는 3-0 Ethilon(Ethicon, Somerville, NJ)으로 각각 봉합하였다.

[0060] 5-2. 성대 운동 검사

[0061] NGC 이식 후 8, 12 및 16주에 내시경 후두 검사를 수행하였다. 토끼를 5 mg/kg의 자일라진 피하 및 15 mg/kg의 졸라제팜 근육 주사로 마취시키고, 실험 동물의 목 상처를 양와위에서 개방한 뒤, 먼저 목 왼쪽에 끼워진 튜브를 확인하였다. 좌측은 삽입된 관을 우측은 정상 RLN을 노출시킨 후, 경성 후두 내시경(Storz, Tuttlingen, Germany)을 삽입하여 후두경 검사를 시행하였다. 그런 다음 1.5mA 전류로 신경 자극기(Maplewood; WR Medical Electronics Co., Saint Paul, MN)를 사용하여 절제된 부위의 근위 2 mm 부위를 자극시켜, 성대 움직임을 확인하고 내전 및 외전 위치에서 이미지를 캡처하고 부하가 없는 NGC 그룹과 PRP가 부하된 NGC 그룹에서 평균 성대 간격 비율(손상된 왼쪽 대 정상 오른쪽)을 계산하였다. 성대 운동의 회복은 이진 척도(예/아니오)로 평가하고, 상대 갭 비율(left.gap/right.gap x 100)을 계산하고 Image J(NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 완전히 외전 및 내전 위치의 삼각형 영역으로 간격을 측정하였다.

[0063] 5-3. 조직 검사

[0064] 내시경 성대 평가 후 동물을 희생시켰으며, RLN 및 신경 절단을 포함한 NGC를 수확하여 신경 성장을 평가하고 후두를 절제하여 성대 근육 상태를 평가하였다. RLN 및 후두를 포함하는 NGC 튜브를 4% 포름알데히드에 고정하고 즉시 파라핀에 포매한 후 절단하였다 (NGC는 세로로 절단하고 후두의 성대 근육은 축방향으로 절단). NGC의 세로 부분은 헤마톡실린 & 에오신 (hematoxylin and eosin, H&E)과 톨루이딘 블루 (toluidine blue)로 염색하였고, 성대 수준의 성대 근육은 H&E로 염색하여 비교하였다. 단일 맹검 관찰자는 현미경 이미지의 윤곽을 추적하여 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 성대 근육의 단면적을 측정하였으며, 좌측 탈신경성 성대 근육의 면적은 정상 우측 근육의 면적에 대한 백분율로 표시하였다.

[0066] 5-4. 조직의 면역조직화학 분석

[0067] NGC 내부의 재생된 조직에서 특정 신경 마커를 식별하기 위해 항아세틸콜린에스테라제(AchE, Abcam, Cambridge, UK), 신경섬유(NF, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 및 항-S100 단백질(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)을 사용하여 면역조직화학 분석을 수행하였다.

[0069] 5-5. 투과 전자 현미경

[0070] 수술 후 8, 12, 16주에 재생된 신경 구조, 특히 NGC의 횡단면을 조사하기 위해 투과 전자 현미경(TEM; 80 kV; Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 검사하였으며, 축색 돌기의 수와 수초화된 섬유 다발의 전체 구조를 비교 분석하였다.

[0072] 6. 통계분석

[0073] Kruskal Wallis 및 Mann-Whitney 테스트는 증식, 이동, 상처 치유 및 표적 단백질 발현에 대한 다양한 PRP 농도영향의 통계적 유의성을 결정하는 데 사용되었으며, Mann-Whitney 테스트는 대조군과 PRP 그룹에서 성대 운동, 성대 근육의 축 단면적, 신경 종말 수의 통계적 유의성을 결정하는 데 사용되었다. 분석은 GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)을 사용하여 수행되었으며 p 값 < 0.05에 대해 통계적 유의성이 있다고 판단하였다.

[0075] **<실시예 1> 사람유래 슈반세포의 증식 및 이동에서 PRP 효과 확인**

[0076] 세포 증식에 대한 PRP의 생체 내 효과를 확인하기 위해, 먼저 다양한 농도(0%, 5% 및 10%)에서 사람유래 슈반세포에 대한 PRP의 영향을 확인하였다.

[0077] 도 3A와 같이 기준선상에서의 세포에서는 전형적인 스핀들 모양 정렬과 양극성 또는 때때로 다중극성 형태를 나타내었다. 세포증식을 확인해본 결과, 도 3B와 같이 PRP를 처리하지 않은 그룹에 비해서 5% 및 10%의 PRP를 처리한 그룹에서 세포증식능이 현저하게 증가된 것을 확인하였다. 또한 트랜스웰 분석을 사용하여 세포 이동에 대

한 다양한 농도의 PRP 효과를 비교한 결과, 도 3C 및 도 3D와 같이 5% 와 10%의 PRP를 처리한 그룹이 PRP를 처리하지 않은 그룹에 비해서 농도의존적으로 더욱 빠르게 이동하는 것을 확인하였다 (각각 $P < 0.05$ 및 $P < 0.0001$).

[0078] 또한 스크래치 상처 치유 방법으로 이동 및 증식을 확인해본 결과, 도 3E 및 도 3F와 같이 10% PRP 처리한 슈반세포는 PRP를 처리하지 않은 슈반세포보다 훨씬 더 높은 이동률을 보였고, 10% PRP 그룹의 세포 이동률은 처리되지 않은 대조군보다 4.25배 더 높았다 ($P < 0.05$).

[0080] **<실시예 2> PRP 처리에 따른 슈반세포의 신경재생관련 단백질 발현 변화 확인**

[0081] 도 4A와 같이 축삭 구조를 둘러싸고 보호하는 미엘린은 수많은 슈반세포로 되어 있으며, 신경 성장 인자를 분비하여 축삭 성장을 촉진한다.

[0082] 이에 따라, 0, 5 및 10 %로 각각 다른 PRP 농도로 처리된 슈반세포에서 신경재생 관련 단백질의 발현을 확인해본 결과, 도 4B와 같이 0, 5, 10%의 PRP 처리 후, NGF 및 NT-3를 포함한 신경영양 인자의 발현은 무처리 대조군보다 높았다. 특히, 도 4C와 같이 5% PRP 처리 세포에서 NT-3의 발현은 PRP 처리되지 않은 세포보다 통계적으로 유의하게 더 높게 나타났다 ($P < 0.05$).

[0083] 또한, 도 4D와 같이 NGF는 비처리 대조군보다 5% PRP 처리된 세포에서 더 많은 발현을 나타내었다 ($P < 0.05$). MAG는 수초와 축삭 사이의 접착 분자이며 축삭 세포골격-인산화에 신호를 보내는 역할을 하는데, 도 4B 및 도 4E와 같이 PRP 처리한 슈반세포에서 MAG 와 MBP 의 발현이 농도 의존적으로 증가함을 확인되었다 ($P < 0.05$). 또한, ERK(MAG-related axon cytoskeleton protein)의 발현은 도 4F와 같이 PRP 처리되지 않은 슈반세포보다 5% PRP 처리된 슈반세포에서 높게 나타났으며, 이러한 경향성을 그림 4G와 같이 개략도와 같다. 슈반세포에서 분비된 NGF 를 측정하기 위하여 사람유래 NGF 특이적 ELISA 로 측정한 결과, 도 4H와 같이 분비된 NGF의 농도는 PRP 처리 농도에 따라 통계적으로 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

[0085] **<실시예 3> 토끼 재발성 후두신경 (RLN) 손상모델에서 PRP 함유 NGC 삽입에 따른 성대 움직임 변화 확인**

[0086] 성대 운동의 내시경 이미지는 NGC 이식 후 8, 12 및 16주에 분석되었으며, 성대 운동의 회복은 이식 후 8주째에 PRP 부하 NGC 또는 부하가 없는 NGC 그룹에서 모두 나타나지 않았다. 이식 후 12주에는 성대 운동의 회복이 비부하 NGC 그룹에서 3마리 중 1마리(33.3%), PRP 로딩된 NGC 그룹에서 4마리 중 2마리(50%)에서 관찰되었으며, 이식 후 16주에는 성대 운동의 회복이 비부하 NGC 그룹의 토끼 4마리 중 2마리(50%) 그리고 PRP 로딩 NGC 그룹의 토끼 5마리 중 4마리(80%)에서 관찰되었다. 도 5A 및 도 5B와 같이 성대 내전과 외전의 상대적인 간격 비율은 PRP 그룹(80.23 ± 6.91%)이 비부하 NGC 그룹(48.99 ± 10.71%)보다 유의하게 높았다($P = 0.018$).

[0088] **<실시예 4> PRP 처리에 따른 성대 근육변화 및 재생된 신경조직의 신경 마커 발현 확인**

[0089] 성대 근육 단면에서 결정된 근육 두께를 비교하였다. 그 결과, 도 5C와 같이 이식 후 16주에 PRP 부하 NGC 그룹에서 오른쪽 및 왼쪽 성대 근육의 축 방향 섹션은 유사했지만 부하가 없는 NGC 그룹에서 왼쪽 성대 근육이 위축됨을 확인하였다. 또한, 도 5D와 같이 성대 근육 면적 비율은 PRP가 부하 NGC 그룹(89.34 ± 6.23%)이 부하되지 않은 NGC 그룹(83.20 ± 6.31%)보다 유의하게 더 높은 것으로 나타났다 ($P = 0.033$).

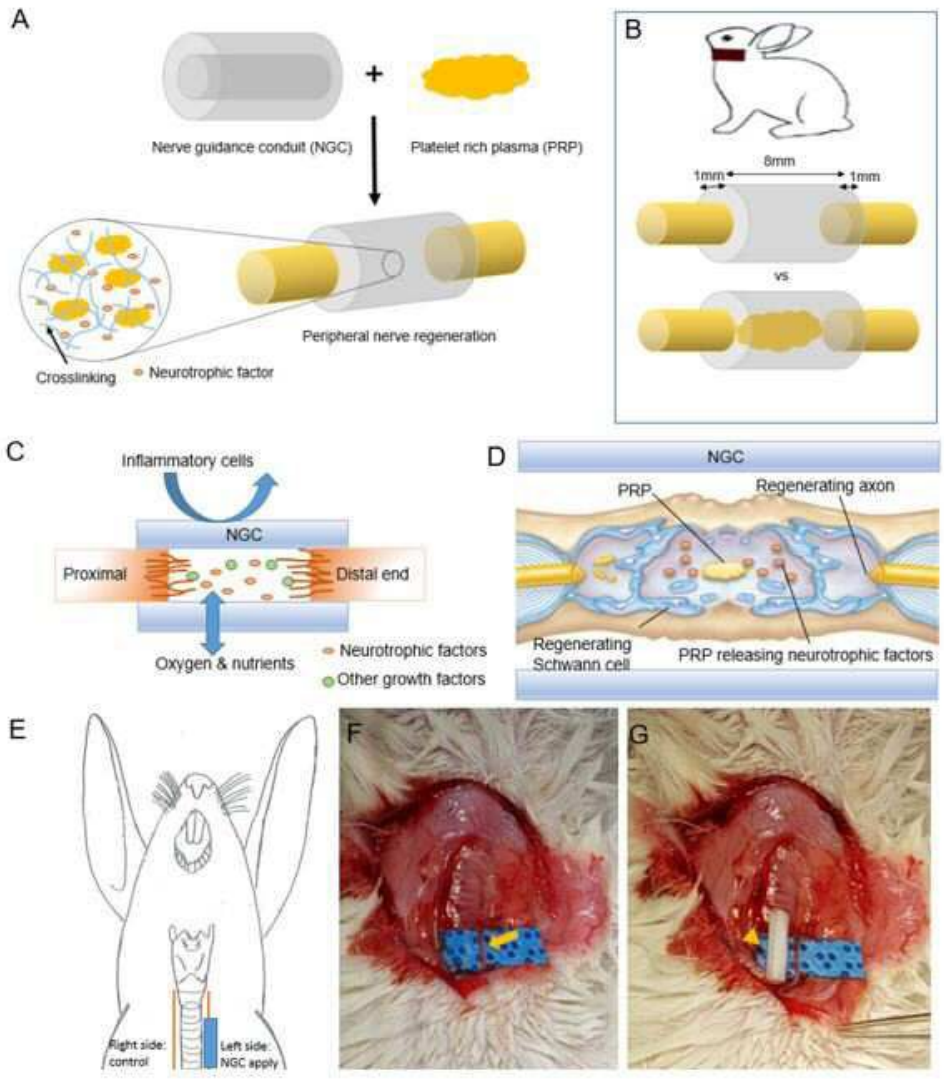
[0090] 도 6A를 참고하면, 이식 후 8, 12, 16주에 RLN을 따라 취한 세로 단면은 NGC 내에서 점진적인 신경 성장을 보여주었으며, 이식 후 8주에 PRP 군에서는 신경 절단에서 유래하는 짧은 구조적 분절이 관찰되었지만 부하되지 않은 PRP NGC 군에서는 관찰되지 않았으며, PRP 부하 NGC 그룹에서는 16주차에 양쪽 절단에 부착된 긴 연결된 신경이 확인되었다. 톨루이딘 블루 염색 결과 도 6B와 같이 PRP가 장착된 NGC 튜브의 종단면에서 16주차에 두 신경 말단 사이의 연결이 확인됨에 따라, 면역조직화학염색분석으로 신진 구조가 신경 조직인지 여부를 확인하였다.

[0091] 흥미롭게도, 도 6C와 같이 이식 후 16주에 NF, S100 및 Ach esterase는 PRP 부하 NGC 그룹의 연결된 신경 조직에서 강하게 발현되었지만 부하가 없는 NGC 그룹에서는 거의 검출되지 않았다. 또한, 16주에 PRP 부하 NGC 그룹에서 재생된 신경의 중간 영역의 TEM 이미지(도 7B)에서 수초 섬유가 비 부하 NGC 그룹보다 더 풍부하고 축삭 섬유가 잘 조직화된 수초와 더 조밀한 것을 확인할 수 있었다 (그림 7A).

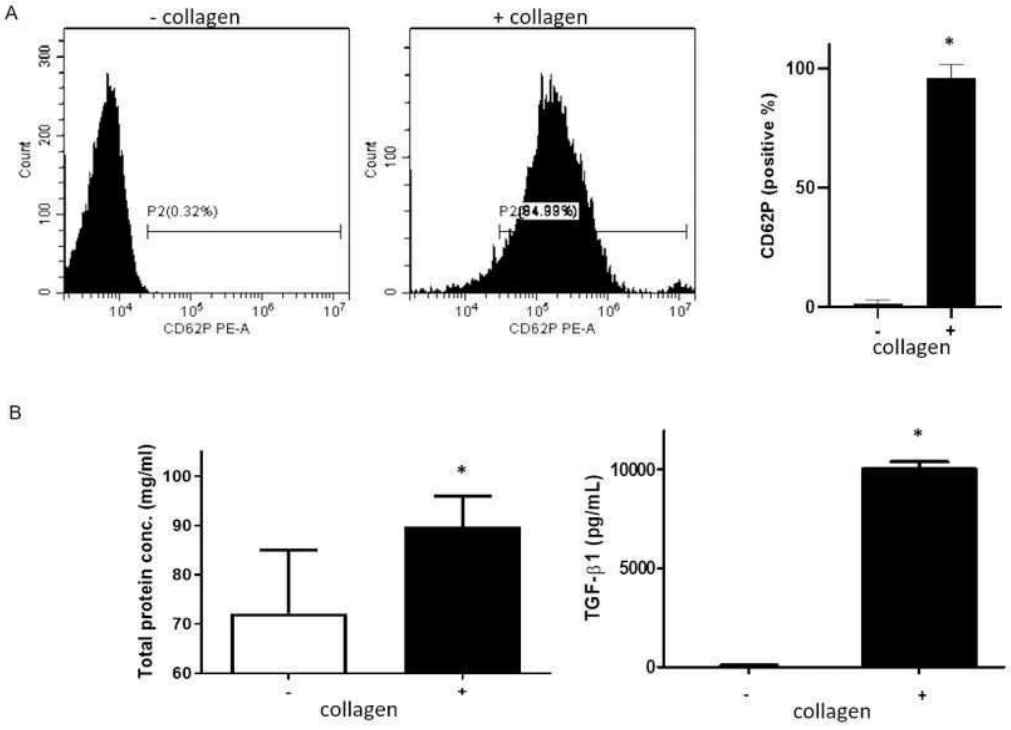
[0093] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

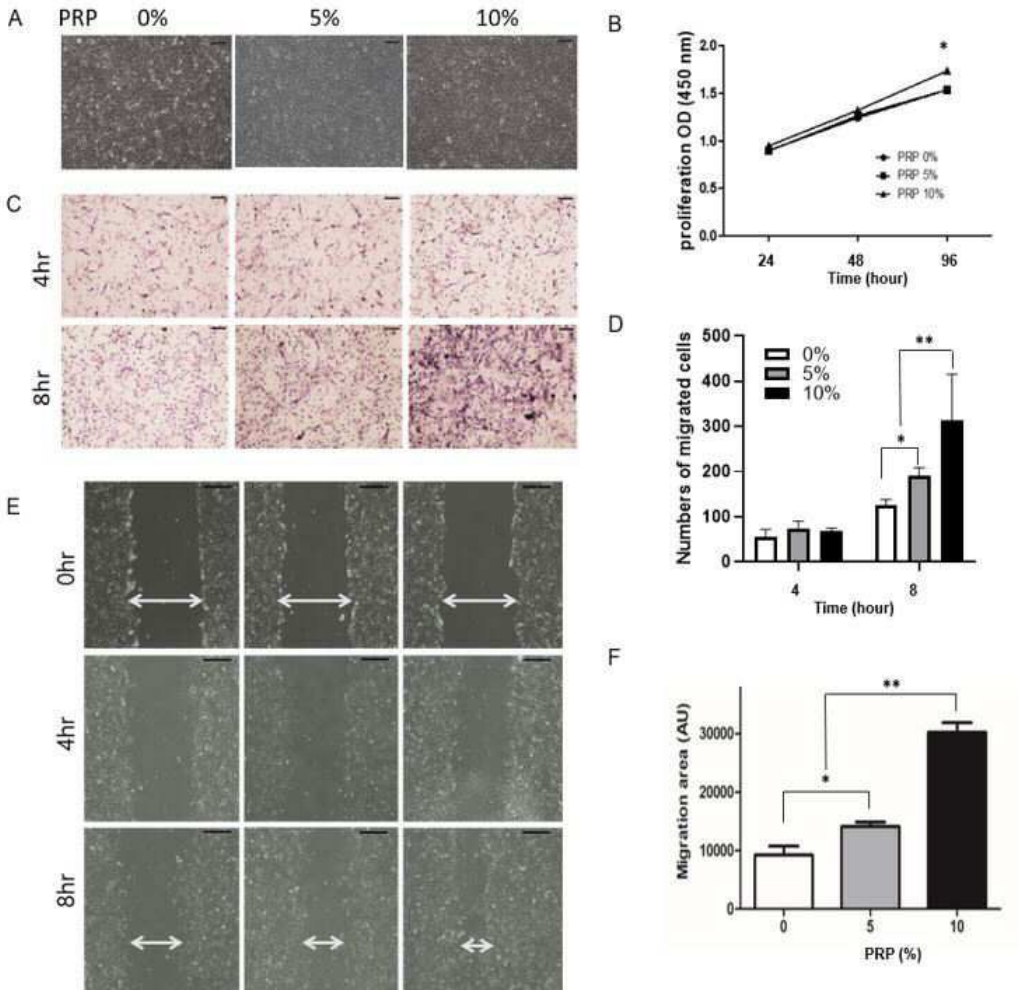
도면1



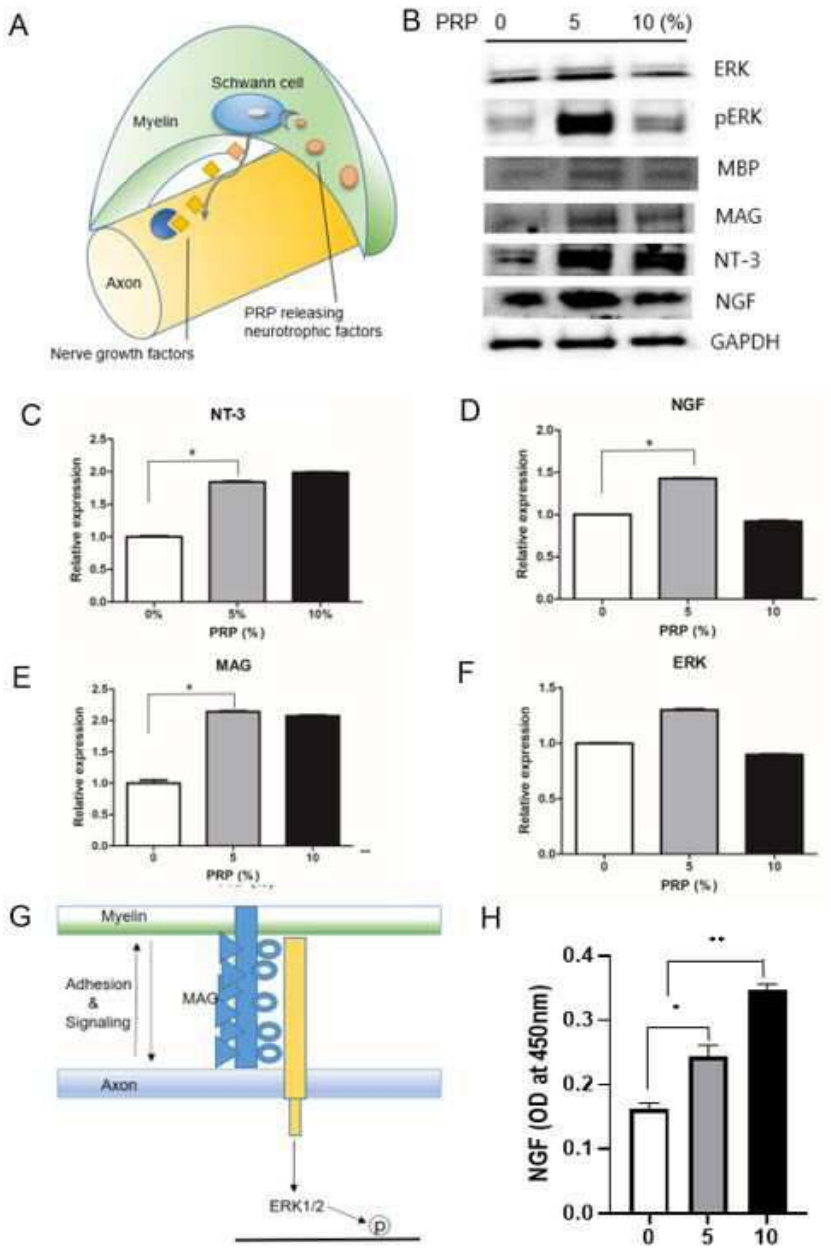
도면2


A
- collagen
+ collagen
Count
P2(0.32%)
P2(84.98%)
CD62P PE-A
CD62P (positive %)
collagen
B
Total protein conc. (mg/ml)
TGF-β1 (pg/mL)
collagen

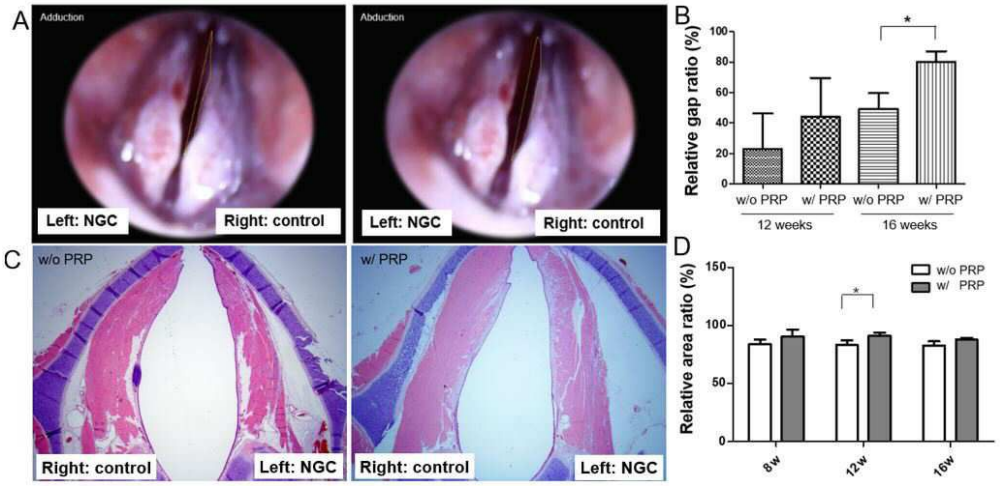
도면3


A
PRP
0%
5%
10%
B
proliferation OD (450 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
PRP 0%
PRP 5%
PRP 10%
24
48
96
Time (hour)
C
4hr
8hr
D
Numbers of migrated cells
500
400
300
200
100
0
0%
5%
10%
**
*
4
8
Time (hour)
E
0hr
4hr
8hr
F
Migration area (AU)
30000
20000
10000
0
**
*
0
5
10
PRP (%)

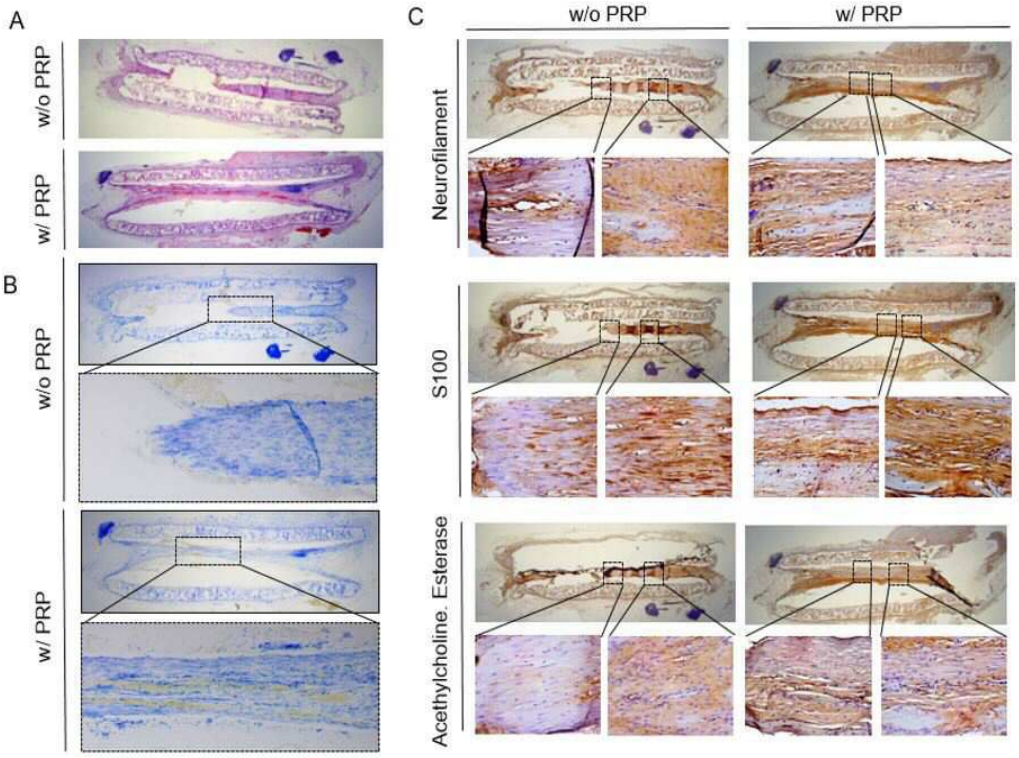
도면4


A
Schwann cell
Myelin
Axon
PRP releasing
neurotrophic factors
Nerve growth factors
B
PRP 0 5 10 (%)
ERK
pERK
MBP
MAG
NT-3
NGF
GAPDH
C
NT-3
Relative expression
PRP (%)
D
NGF
Relative expression
PRP (%)
E
MAG
Relative expression
PRP (%)
F
ERK
Relative expression
PRP (%)
G
Myelin
Adhesion
&
Signaling
MAG
Axon
ERK1/2
p
H
NGF (OD at 450nm)

도면5


A
Adduction
Left: NGC
Right: control
Abduction
Left: NGC
Right: control
B
Relative gap ratio (%)
100
80
60
40
20
0
*
w/o PRP
w/ PRP
w/o PRP
w/ PRP
12 weeks
16 weeks
C
w/o PRP
Right: control
Left: NGC
w/ PRP
Right: control
Left: NGC
D
Relative area ratio (%)
150
100
50
0
*
w/o PRP
w/ PRP
8w
12w
16w

도면6


A
w/o PRP
w/ PRP
B
w/o PRP
w/ PRP
C
w/o PRP
w/ PRP
Neurofilament
S100
Acethylcholine. Esterase

도면7

