



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0095525
(43) 공개일자 2023년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/64 (2006.01) G01N 21/66 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/6458 (2013.01)
G01N 21/6486 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0185096
(22) 출원일자 2021년12월22일
심사청구일자 2021년12월22일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(72) 발명자
김성현
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 의과대학 901호(회기동)
방석영
서울특별시 성북구 돌곶이로40길 46, 706동 101호(장위동, 꿈의숲아이파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 8 항

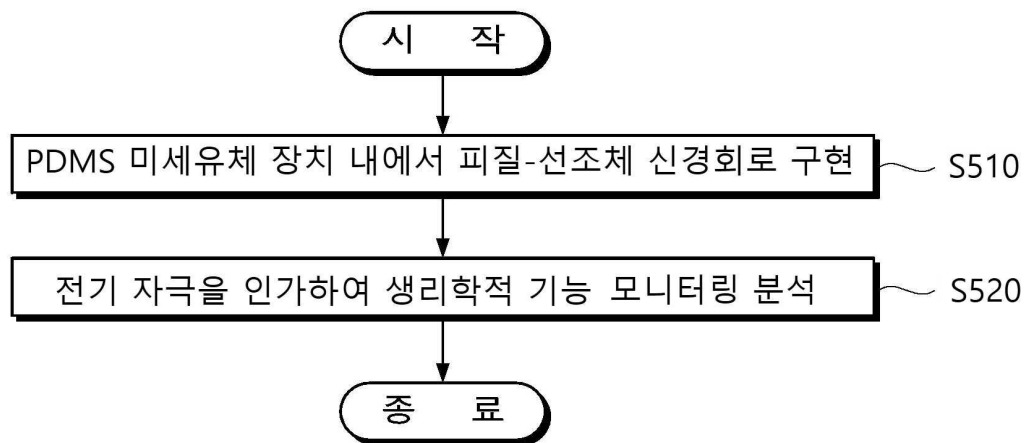
(54) 발명의 명칭 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법

(57) 요약

본 발명은 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 미세유체 장치를 이용한 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법에 있어서 상기 미세유체 장치 내에서 피질 세포와 선조체 세포를 각 채널을 따라 성장시키고 각 채널이 만나는 공간에서 서로 결합시켜서 피질-선조체 신경회로(cortico-striatal circuit)를 생성하는 단계, 및 상기 각 채널 내의 세포에 대해 칼슘인자 분석을 위한 칼슘 형광 센서를 부착한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 상기 피질-선조체 회로의 칼슘 수치 변화를 영상 촬영을 통하여 모니터링하는 단계를 포함한다.

본 발명에 따르면, 미세유체장치 내에서 배양한 뇌 조직의 미세신경회로에 전기를 인가하여 전자기적 신경 활성을 유도하고 그에 따른 생리학적 기능과 특성 변화를 모니터링할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 21/66 (2013.01)

G01N 33/4833 (2013.01)

(72) 발명자

최낙원

서울특별시 강동구 상암로79길 88, 711동 1504호(상일동, 고덕 롯데캐슬 베네루체)

김홍남

서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 102동 2301호(종암동, 래미안라센트)

한석민

서울특별시 송파구 새말로8길 12, 101동 1502호(문정동, 건영아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711133404

과제번호 2017M3C7A1025604

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발(R&D)

연구과제명 대뇌피질 신경망 작동기전 · 가소성 기반 통증관정 및 통증조절 원천기술 개발

기 여 율 9/10

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711145611

과제번호 2020R1A2C2010791

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 흥분성/억제성 신경세포 특이적 소포체-미토콘드리아에 의한 뇌신경회로기능 조절

기전 규명

기 여 율 1/10

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

미세유체 장치를 이용한 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법에 있어서,

상기 미세유체 장치 내에서 피질 세포와 선조체 세포를 각 채널을 따라 성장시키고 각 채널이 만나는 공간에서 서로 결합시켜서 피질-선조체 신경회로(cortico-stratal circuit)를 생성하는 단계; 및

상기 각 채널 내의 세포에 대해 칼슘인자 분석을 위한 칼슘 형광 센서를 부착한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 상기 피질-선조체 회로의 칼슘 수치 변화를 영상 촬영을 통하여 모니터링하는 단계를 포함하는 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 영상 촬영은 형광 현미경에 의해 이루어지는 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 칼슘 형광 센서는,

케미컬 칼슘 센서 또는 유전자 칼슘 센서인 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 모니터링하는 단계는,

서로 다른 크기의 전기 자극을 개별 인가하여 관측되는 형광 밝기를 이용하여 전기 자극 크기에 따른 칼슘 수치 변화를 모니터링하는 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 모니터링하는 단계는,

설정 크기를 가지고 서로 다른 시간 간격으로 구성된 복수의 페어 펄스(pair-pulse)를 시간 순으로 인가하여 관측되는 각 페어 펄스에 대한 형광 밝기 비율($PPR=P2/P1$; $i=\{1,2\}$, P_i 은 i 번째 펄스에 따른 형광 밝기)를 이용하여 칼슘 수치 변화를 모니터링하는 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 시간 간격이 짧은 페어 펄스일수록 상기 형광 밝기 비율이 감소하는 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 각 채널 내의 세포에 대해 시냅스 트랜스미션(Synapse transmission) 분석을 위한 유전자 형광 센서를 부착한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 상기 피질-선조체 회로의 신경전달물질 방

출량 변화를 영상 촬영을 통하여 모니터링하는 단계를 더 포함하는 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 전기 자극의 크기는,

목표로 하는 세포의 활동 전위(AP)의 크기에 대응하여 결정되는 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미세유체장치 내에서 뇌 조직의 전전두엽 피질(prefrontal cortex)과 선조체(striatum) 사이의 미세 회로(cortico-striatal circuit)를 재현하고 그 생리학적 기능을 모니터링할 수 있는 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] PDMS(Polydimethylsiloxane)는 유기규소 화합물로 투명하면서 독성이 낮고 불연성이기 때문에 생물학, 의학, 약학, 재료공학 및 기계공학 등 다양한 분야에 걸쳐 널리 사용되는 물질이다. 특히, 우수한 생체적합성으로 인해 장기모사 칩 연구 등에 활용되고 있다.

[0003] PDMS는 점탄성의 특성을 가지고 있기 때문에 경화제를 첨가해 중합과정을 거쳐(cross-link) 세포를 배양할 수 있는 형태를 유지할 수 있게 한다. 또한, PDMS는 표면의 소수성의 성질을 가지고 있기 때문에 플라즈마 코팅을 이용하여 친수성으로 표면개질을 시켜 커버글라스와의 부착력을 증가시킬 수 있다.

[0004] pHluorin (pH)은 pH 변화에 따라 밝기가 달라지는 유전자 형광 센서로 생물학적 연구의 도구로써 널리 사용되고, 다양한 응용이 가능하다. 예를 들어, pHluorin을 신경세포의 시냅스 소낭을 구성하는 단백질에 발현 되도록 클로닝을 하고, 전기 자극을 주어 live-cell imaging을 수행한다면 신경전달물질의 방출을 실시간 이미징 영상으로 확인 가능하다.

[0005] 생후 1~2일 지난 쥐의 뇌에서 직접 전전두엽 피질과 선조체를 각각 추출하여 세포 배양을 진행하면 배양 후 14일 경과 시 각 세포들이 서로 연결되어 회로를 형성하고 신경세포의 생리학적 특성 및 기능들을 보인다.

[0006] 전전두엽 피질과 선조체 사이의 회로인 피질-선조체 신경회로(cortico-striatal circuit)는 전뇌 안에 존재하는 중추적인 회로이며, 인지 및 보상 작용 등과 관련된 목표 지향 행동에 관여하고 있다. cortico-striatal circuit의 이상은 자폐증, 헌팅턴병 등과 같은 신경질환들을 유발한다고 보고되어 있다.

[0007] 따라서 뇌 조직의 수많은 회로들 사이에서 특정 단일 회로인 cortico-striatal circuit에 관한 생리학적 기능을 모니터링하고 이를 기반으로 뇌신경질환과 관련된 각종 질환 모델을 분석할 수 있는 기법이 요구된다.

[0008] 본 발명의 배경이 되는 기술은 한국공개특허 제2017-0051072호(2017.05.11)에 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 미세유체장치 내에서 배양한 뇌 조직의 미세신경회로에 전기를 인가하여 전자기적 신경 활성을 유도하고 그에 따른 생리학적 기능을 모니터링할 수 있는 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은, 미세유체 장치를 이용한 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법에 있어서, 상기 미세유체 장치 내에서 피질 세포와 선조체 세포를 각 채널을 따라 성장시키고 각 채널이 만나는 공간에서 서로 결합시켜서 피질-선조체 신경회로(cortico-striatal circuit)를 생성하는 단계, 및 상기 각 채널 내의 세포에 대해 칼슘인자 분석을 위한 칼슘 형광 센서를 부착한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 상기 피질-선조

체 회로의 칼슘 수치 변화를 영상 촬영을 통하여 모니터링하는 단계를 포함한다.

[0011] 또한, 상기 영상 촬영은 형광 현미경에 의해 이루어질 수 있다.

[0012] 또한, 상기 칼슘 형광 센서는, 케미칼 칼슘 센서 또는 유전자 칼슘 센서일 수 있다.

[0013] 또한, 상기 모니터링하는 단계는, 서로 다른 크기의 전기 자극을 개별 인가하여 관측되는 형광 밝기를 이용하여 전기 자극 크기에 따른 칼슘 수치 변화를 모니터링할 수 있다.

[0014] 또한, 상기 모니터링하는 단계는, 설정 크기를 가지고 서로 다른 시간 간격으로 구성된 복수의 페어 펄스(pair-pulse)를 시간 순으로 인가하여 관측되는 각 페어 펄스에 대한 형광 밝기 비율($PPR=P2/P1$; $i=\{1,2\}$, P_i 은 i 번째 펄스에 따른 형광 밝기)를 이용하여 칼슘 수치 변화를 모니터링할 수 있다.

[0015] 또한, 상기 시간 간격이 짧은 페어 펄스일수록 상기 형광 밝기 비율이 감소할 수 있다.

[0016] 또한, 상기 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법은, 상기 각 채널 내의 세포에 대해 시냅스 트랜스미션(Synapse transmission) 분석을 위한 유전자 형광 센서를 부착한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 상기 피질-선조체 회로의 신경전달물질 방출량 변화를 영상 촬영을 통하여 모니터링하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 상기 전기 자극의 크기는, 목표로 하는 세포의 활동 전위(AP)의 크기에 대응하여 결정될 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면, 미세유체장치 내에서 배양한 뇌 조직의 미세신경회로에 전기를 인가하여 전자기적 신경 활성을 유도하고 그에 따른 생리학적 기능과 특성 변화를 모니터링할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 PDMS 기반 미세유체장치를 보여준 도면이다.

도 2a 및 도 2b는 본 발명의 실시예에 따른 미세유체 장치의 모식도이다.

도 3a는 미세유체 장치에서 전전두엽 피질 세포와 선조체 세포를 배양하여 얻은 각 신경 세포의 축삭돌기와 가지돌기에 대한 형광 이미지를 나타낸 도면이다.

도 3b는 미세유체 장치에서 배양된 전전두엽 피질 세포와 선조체 세포가 각 채널을 따라 성장하여 시냅스 챔버에서 결합하여 회로를 형성한 모습에 대한 형광 이미지를 나타낸 도면이다.

도 4는 미세유체 장치의 각 채널에서 배양되는 세포를 마커(anti-Tau-axon, anti-Map2-dendrite)를 사용하여 염색한 모습을 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 실시예에 따른 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법을 설명하는 도면이다.

도 6은 본 발명의 실시예에 따라 생성한 뇌 신경 회로에 전기 자극을 주었을 때, 유입되는 칼슘을 케미칼 칼슘 센서(Fluo-5F) 반응으로 관찰한 현미경 이미지를 예시한 도면이다.

도 7은 미세유체 장치에서 1 AP와 10 AP의 서로 다른 강도의 전기 자극에 따라 유입되는 칼슘량을 케미칼 칼슘 센서(Fluo-5F) 반응을 통해 분석한 결과이다.

도 8은 미세유체 장치에서 매우 짧은 간격(50 ms, 100 ms, 200 ms, 500ms)의 전기 자극에 따른 칼슘 다이내믹스를 케미칼 칼슘 센서(Fluo-5F) 반응을 통해 측정된 결과이다.

도 9는 본 발명의 실시예에 따라 생성한 뇌 신경 회로에 전기 자극을 주었을 때, 유입되는 칼슘을 유전자 칼슘 센서(Physin-GCaMP6f) 반응으로 관찰한 현미경 이미지를 예시한 도면이다.

도 10은 미세유체 장치에서 1 AP와 10 AP서로 다른 강도의 전기 자극에 따라 유입되는 칼슘량을 유전자 칼슘 센서(Physin-GCaMP6f) 반응을 통해 분석한 결과이다.

도 11은 미세유체 장치에서 매우 짧은 간격(50 ms, 100 ms, 200 ms, 500ms)의 전기 자극에 따른 칼슘 다이내믹스를 유전자 칼슘 센서(Physin-GCaMP6f)로 측정된 결과이다.

도 12는 본 발명의 실시예에 따른 미세유체 장치에서 배양된 전전두엽 피질 세포와 선조체 세포가 각 채널을 따라 성장하여 시냅스 챔버에서 결합하여 회로를 형성한 모습을 형광(synapto-pH)으로 나타낸 것이다.

도 13은 미세유체 장치에서 100 AP의 전기 자극에 따라 방출되는 신경전달물질을 유전자 형광 센서(synapto-pH) 반응을 통해 측정된 결과이다.

도 14는 본 발명의 실시예에 따라 생성한 뇌 신경 회로에 전기 자극을 주었을 때, 신경전달물질이 방출되는 생리학적 현상을 유전자 형광 센서(vGlut-pH) 반응을 통해 측정된 결과이다.

도 15는 미세유체 장치에서 50 AP, 100 AP, 300 AP, 각 다른 강도의 전기 자극에 따라 방출되는 신경전달물질을 유전자 형광 센서(vGlut-pH) 반응을 통해 측정된 결과이다.

도 16은 본 발명의 실시예에 따른 미세유체 장치에서 전기 자극에 의해 방출된 시냅스 소낭이 다시 들어와 재촬영되는 시간을 측정된 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 그러면 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시 예에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시 예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0021] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명은 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법에 관한 것으로, PDMS(Polydimechylsiloxane) 기반의 미세유체 장치에서 전전두엽 피질과 선조체 세포를 배양하여 in vitro(생체 외)에서 cortico-striatal circuit, 단일 회로를 구현하였으며, 그에 대한 생리학적 특성을 영상화(imaging)을 통해 확인하였다.
- [0023] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 PDMS 기반 미세유체장치를 보여준 도면이다. 도 1에 나타난 것과 같이, 미세유체 장치는 PDMS를 기반으로 제작되며 제작 과정은 다음과 같다.
- [0024] 먼저, 미세유체 장치의 실리콘 웨이퍼 (Silicon wafer) 패턴을 제작한다. 이는 미세유체 장치의 디자인 패턴을 실리콘 웨이퍼로 제작하는 단계에 해당한다. 다음으로, 제작된 실리콘 웨이퍼에서 PDMS를 경화한다. 이때, PDMS 시약, Sylgard 184 A/B (Dow Corning)를 1:10 비율로 섞은 후, 오븐에서 80℃에서 1시간 동안 중합과정 (cross-link)를 거쳐 PDMS를 경화시킬 수 있다.
- [0025] 다음, 경화시킨 PDMS에 플라즈마 처리를 하여 커버그라스와 결합시킨다. PDMS와 커버그라스 바깥 표면을 기체 산소로 플라즈마 코팅(PE, 80W, 50kHz, 40초)을 진행하여 표면개질된 상태로 부착시킨다. 도 1은 제작된 미세유체 장치의 모습을 보여준다.
- [0026] 여기서, 미세유체 장치의 내부 공간 즉, 각종 채널은 세포의 부착 및 성장 효율을 높이는 물질이 벽면에 코팅될 수 있다. 예를 들어, 세포의 부착과 성장에 용이하도록 미세유체 장치의 내측 채널과 시냅스 챔버를 Poly-L-ornithine으로 코팅시킨 후 세포 배양을 진행할 수 있다. 미세유체장치의 제작 과정은 반드시 이에 한정되지 않으며 보다 다양한 실시예가 존재할 수 있다.
- [0027] 도 2a 및 도 2b는 본 발명의 실시예에 따른 미세유체 장치의 모식도이다.
- [0028] 도 2a 및 도 2b와 같이, 미세유체 장치는 제1 및 제2 투입 챔버(10,20), 제1 및 제2 채널(30,40), 시냅스 챔버(50), 그리고 제1 및 제2 전극 채널(60,70)을 포함한다.
- [0029] 제1 투입 챔버(10)는 전전두엽 피질 세포가 투입되고, 제2 투입 챔버(20)는 선조체 세포가 투입된다. 제1 채널(30)은 제1 투입 챔버(10)와 연결되고 제2 채널(40)은 제2 투입 챔버(20)와 연결된다. 제1 투입 챔버(10)에 투입된 전전두엽 피질 세포는 제1 채널(30)을 따라 성장 및 배양되고, 제2 투입 챔버(20)에 투입된 선조체 세포는 제2 채널(40)을 따라 성장 및 배양된다.

- [0030] 이들 두 채널(30,40) 간을 연결하는 시냅스 채널(50)은 각 채널(30,40)을 따라 성장한 피질 세포와 선조체 세포가 서로 만나 결합되는 공간이다. 미세유체 장치 내에서 이와 같은 세포 간 결합을 유도하여 피질-선조체 신경회로(cortico-striatal circuit)가 구현된다. 도 2a의 우측 그림은 서로 다른 두 채널을 따라 성장한 피질 세포의 축삭돌기(Cortical axon)와 선조체의 가지돌기(Striatal dendrite)가 서로 만나 결합되어 신경회로를 형성하는 개념을 설명한 것이다.
- [0031] 제1 전극 채널(60)은 제1 채널(30)과 연결되며, 제1 채널(30) 내 배양되는 전전두엽 피질 세포에 전기 자극을 인가하기 위한 전극(61)이 배치된다. 제2 전극 채널(70)은 제2 채널(40)과 연결되며, 제2 채널(40) 내 배양되는 선조체 세포에 전기 자극을 인가하기 위한 전극(71)이 배치된다. 각각의 전극 채널(60,70)은 음과 양의 전극 인가를 위해 각 채널(30,40)에 한 쌍으로 연결될 수 있다.
- [0032] 본 실시예에서 각각의 투입 챔버(10,20)는 각 채널(30,40)의 길이 방향 양단에 한 쌍으로 형성되고 각 채널(30,40)은 그 길이 방향의 중앙 부분이 시냅스 채널(50)을 통해 연결되는 구조를 예시한다. 시냅스 채널(50)은 각 채널(30,40) 사이를 연결하는 서로 평행한 내측 미세채널(51)과 이들을 교차하여 연결하는 수직 채널(52)을 포함하여 구성되고 상호 간 연결 부위가 서로 연통된다. 미세채널(51)은 그 길이 방향의 일부분이 제1 채널(30)에, 나머지 부분은 제2 채널(52)에 귀속될 수 있다.
- [0033] 일반적으로 미세유체 장치에서 가지돌기는 500um 이상 성장이 힘들기 때문에, 도 2b와 같이 축삭돌기와 가지돌기만을 구분하기 위하여 축삭돌기를 위한 채널의 길이는 1mm, 가지돌기를 위한 채널의 길이는 400um로 디자인하여 제작하였다. 이를 통한 각 세포의 성장 모습과 회로 형성 모습은 도 3a 및 도 3b를 참조한다.
- [0034] 도 3a는 미세유체 장치에서 전전두엽 피질 세포와 선조체 세포를 배양하여 얻은 각 신경 세포의 축삭돌기와 가지돌기에 대한 형광 이미지이고, 도 3b는 미세유체 장치에서 배양된 전전두엽 피질 세포와 선조체 세포가 각 채널을 따라 성장하여 시냅스 채널에서 결합하여 회로를 형성한 모습에 대한 형광 이미지를 나타낸다.
- [0035] 그 결과, 도 3a와 같이 전전두엽 피질과 선조체의 세포 모두 각 축삭돌기 채널과 가지돌기 채널을 따라 잘 성장하였고, 도 3b와 같이 시냅스 챔버에서 피질-선조체 신경회로(cortico-striatal circuit)의 형성을 확인하였다.
- [0036] 도 4는 미세유체 장치의 각 채널에서 배양되는 세포를 마커(anti-Tau-axon, anti-Map2-dendrite)를 사용하여 염색한 모습을 나타낸 도면이다. 이러한 도 5는 본 발명에 따른 미세유체 장치가 제대로 작동하는지를 확인하기 위해 테스트한 것에 해당한다.
- [0037] 본 발명의 실시예에서 PDMS 미세유체 장치에서 배양되는 세포들은 생후 1~2일 지난 쥐의 뇌에서 직접 전전두엽 피질과 선조체로부터 추출되었다. 그리고 PDMS 미세유체 장치에서 배양되는 세포들은 형광 센서가 부착되도록 유전자에 형질도입(transfection)이 진행되었다. 형광 센서는 전기 자극에 따른 칼슘 유입 또는 신경전달물질 방출을 관측하기 위한 것이다.
- [0038] 형질도입(transfection)은 전기천공법(electroporation)을 사용하여 진행되었고, 조건은 poring pulse(voltage:175V, length:2.5ms, interval:50ms, number:2, D. Rate: 10%, polarity:+), transfer pulse(voltage:20V, length:50ms, interval:50ms, number:5, D. Rate: 40%, polarity:+/-)이다.
- [0039] 그리고, PDMS 미세유체 장치에서 형성된 cortico-striatal, 단일 회로에서 생리학적 기능들의 확인을 위해 형광 현미경(fluorescent microscope)이 사용되었다. 각 세포는 DIV (Day in vitro) 환경에서 13일간 배양되었고, DIV 14~20 동안 live-cell imaging을 진행하여 측정 및 분석하였다. 생리학적 기능들은 전기 자극에 의한 칼슘 유입, 신경전달물질 방출과 재활용을 측정 및 분석하였다.
- [0040] 신경세포의 생리학적 기능에서 칼슘의 역할은 대단히 중요하다. 특히, 아주 소량의 칼슘이 활동전위(action potential)에 의해 수행되는 시냅스 소낭의 방출을 조절하는데 주요한 역할을 하고 있다.
- [0041] 본 발명의 실시예는 전전두엽 피질과 선조체에서 각 다른 타입의 신경세포를 배양하여, in vitro 에서 단일 회로인 cortico-striatal circuit만을 형성하고, 형성된 단일 회로에서 전기 자극에 의한 생리학적 기능 또한 형광 현미경을 통해 영상화 및 분석하도록 한다.
- [0042] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 미세유체장치 기반 생체의 뇌신경회로 기능 모니터링 방법을 설명하는 도면이다.
- [0043] 도 5와 같이, 먼저 PDMS 기반의 미세유체 장치 내에서 피질-선조체 신경회로를 구현한다(S510). 구체적으로, 미세유체 장치 내에서 피질 세포와 선조체 세포를 각 채널을 따라 성장시키고 피질 세포와 선조체 세포를 각 채널

이 만나는 공간에서 서로 결합시켜서 피질-선조체 신경회로(cortico-stratal circuit)를 생성한다.

- [0044] 다음, 미세유체장치 내에서 배양한 뇌 조직의 피질-선조체 신경회로에 전기를 인가하여 전자기적 신경 활성을 유도하고 그에 따른 생리학적 기능을 모니터링한다(S520).
- [0045] 이러한 S510 단계는 두 가지 경우를 포함하는데, 본 발명의 실시예는 칼슘 형광 센서를 통한 칼슘 수치 변화 모니터링 과정과, 유전자 형광 센서를 통한 신경전달물질 방출량 변화 모니터링 과정을 포함할 수 있다.
- [0046] 먼저, 칼슘 형광 센서를 이용한 칼슘 수치 변화 모니터링 방법에 관하여 설명한다. 본 발명의 실시예는, 각 채널 내의 세포에 대해 칼슘인자 분석을 위한 칼슘 형광 센서를 부착한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 상기 피질-선조체 회로의 칼슘 수치 변화를 형광 현미경의 영상 촬영을 통하여 모니터링한다.
- [0047] 구체적인 실시예는 다음의 도 6 내지 도 11을 통하여 설명한다. 칼슘 형광 센서는 형광물질 단백질을 이용한 칼슘 센서(calcium sensor)를 의미하며, 제조 방식에 따라 케미컬 칼슘 센서(화학적 합성된 칼슘 센서)와, 유전자 칼슘 센서(유전자 재조합 칼슘 센서)로 구분될 수 있다.
- [0048] 도 6 내지 도 8은 칼슘 형광 센서로 케미컬 칼슘 센서(Fluo-5F)를 사용한 경우이고, 도 9 내지 도 11은 유전자 칼슘 센서(PhySIN-GCaMP6f)를 사용한 경우를 예시한 것이다.
- [0049] 생체의 구현한 미세유체 채널 내 뇌 신경 회로에 전기 자극을 인가하면 전자기적 신경 활성 반응이 일어나면서 칼슘 수치가 증가하게 된다. 칼슘 수치는 형광 현미경에 의해 관측되는 세포에 부착된 형광 센서의 형광 밝기 혹은 형광 지수를 토대로 획득될 수 있다. 형광 밝기의 증가는 칼슘량의 증가를 의미한다. 이때 형광 밝기는 이미지 내 각 픽셀의 형광 밝기 평균 혹은 그 밖의 다른 조합을 이용할 수도 있고, 이미지 내 미리 설정된 타겟 영역, 예를 들어 시냅스 연결 부위 상의 관심 픽셀들에 대한 형광 밝기 평균 혹은 그 조합을 활용할 수도 있다. 형광 강도를 얻는 방식에는 다양한 실시예가 존재할 수 있다. 물론 형광 밝기는 픽셀의 형광 밝기를 설정 알고리즘이나 수학적식에 의해 가공한 값에 해당할 수도 있다.
- [0050] 본 발명의 실시예에서, 전기 자극은 여러 크기의 전기 자극을 순차로 적용하고 그에 대한 형광 세기 반응을 이용하는 방법과, 서로 다른 간격으로 구성된 페어 펄스를 순차로 적용하고 페어에 해당하는 두 펄스의 형광 밝기 비율을 이용하는 방법으로 구분될 수 있다.
- [0051] 도 6은 본 발명의 실시예에 따라 생성한 뇌 신경 회로에 전기 자극을 주었을 때 유입되는 칼슘을 케미컬 칼슘 센서(Fluo-5F) 반응을 보여주는 이미지이다. 여기서 resting은 전극 인가 전에 관측된 형광 이미지이고, responsive circuits(ΔF)는 자극 전 대비 자극 후 관측된 이미지의 형광 강도 차이에 관한 이미지이고, 10AP는 10활동전위에 해당하는 크기의 전기 자극이 인가된 상태의 형광 이미지를 나타낸다.
- [0052] 본 발명의 실시예에서 전기 자극의 크기는 목표로 하는 세포의 활동 전위(AP)의 크기에 대응하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 1AP는 1 활동전위에 해당하는 전압 크기를 전기 자극으로 인가한 것이고, 10AP는 10 활동전위에 해당하는 전압 크기를 인가한 것에 해당할 수 있다.
- [0053] 도 7은 미세유체 장치에서 1 AP와 10 AP의 서로 다른 강도의 전기 자극에 따라 유입되는 칼슘량을 케미컬 칼슘 센서(Fluo-5F) 반응을 통해 분석한 결과이다. 이러한 도 7은 서로 다른 파워의 전기 자극을 각각 인가하는 경우 그에 대응하여 이미지로부터 관측된 형광 세기 변화를 모니터링한 결과를 나타낸다.
- [0054] 본 발명의 실시예에서는 전기 자극에 따른 형광 세기(강도)를 $\Delta F/F_0$ 값으로 가공하여 분석한다. 여기서 ΔF 는 F_0 와 F 의 편차를 의미하며, F_0 는 전기 자극 전에 관측된 이미지(기준 이미지)에서 분석된 형광 밝기(강도) 관측값을 의미할 수 있고, F 는 전기 자극 인가 시에 관측된 이미지에서 분석된 형광 밝기 값에 해당할 수 있다.
- [0055] 도 7의 A와 B는 10AP와 1AP에 해당하는 전기 자극을 인가 시에 분석된 $\Delta F/F_0$ 값을 비교한 도면이다. 그 결과, 1AP와 비교하여 10 AP에서는 약 5배 정도 증가된 칼슘 유입에 의한 형광 밝기가 측정된 것을 알 수 있다(10 AP : $\Delta F/F_0=2.26\pm0.43$, $N=12$, 1 AP : $\Delta F/F_0=0.55\pm0.08$, $N=12$). N 은 샘플 수를 나타낸다.
- [0056] 도 7의 C와 D는 1AP와 10AP의 전기 자극에 각각에 대하여 N 번의 테스트를 시행하여 얻어지는 $\Delta F/F_0$ 관측값의 분포도를 나타낸 것이다. 이로부터 10 AP의 경우 $\Delta F/F_0=2.26\pm0.43$, 1 AP의 경우 $\Delta F/F_0=0.55\pm0.08$ 가 얻어진다.
- [0057] 이와 같이, 본 발명의 실시예는 서로 다른 크기의 전기 자극을 개별 인가하여 관측되는 형광 밝기를 이용하여

전기 자극 크기에 따른 칼슘 수치의 변화 정도나 추이를 모니터링할 수 있다.

- [0058] 도 8은 미세유체 장치에서 매우 짧은 간격(50 ms, 100 ms, 200 ms, 500ms)의 전기 자극에 따른 칼슘 다이내믹스를 케미칼 칼슘 센서(Fluo-5F) 반응을 통해 측정된 결과이다.
- [0059] 이러한 도 8은 서로 다른 시간 간격(50 ms, 100 ms, 200 ms, 500ms)으로 구성된 복수의 페어 펄스(pair-pulse)를 시간 순으로 인가하여 관측된 각 페어 펄스에 대한 형광 밝기 비율($PPR=P2/P1$; $i=\{1,2\}$, P_i 은 i 번째 펄스에 따른 형광 밝기)를 이용하여 칼슘 수치 변화를 모니터링하는 방식이다. 여기서 $P1$ 은 페어 펄스를 구성한 두 펄스 중 첫 번째 펄스 인가 시 관측된 형광 밝기이고 $P2$ 는 두 번째 펄스 인가시 관측된 형광 밝기를 나타낸다. 여기서 각 펄스의 인가 크기(펄스 강도)는 동일하다.
- [0060] 이러한 도 8의 결과로부터 시간 간격이 짧은 페어 펄스일수록 형광 밝기 비율($P2/P1$)이 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 전기 자극 사이의 간격이 길어질수록 $P2/P1$ 비율값(PPR)이 증가하는 것을 확인하였다(PPR ; 50 ms: 0.81 ± 0.09 , 100 ms: 0.87 ± 0.08 , 200ms: 0.94 ± 0.04 , 500 ms: 0.96 ± 0.02).
- [0061] 또한, 케미칼 칼슘 센서가 아닌 유전자 칼슘 센서를 이용하여 실험을 진행한 결과는 다음과 같다.
- [0062] 도 9는 본 발명의 실시예에 따라 생성한 뇌 신경 회로에 전기 자극을 주었을 때, 유입되는 칼슘을 유전자 칼슘 센서(PhySIN-GCaMP6f) 반응으로 관찰한 현미경 이미지를 예시한 도면이고, 도 10은 미세유체 장치에서 1 AP와 10 AP서로 다른 강도의 전기 자극에 따라 유입되는 칼슘량을 유전자 칼슘 센서(PhySIN-GCaMP6f) 반응을 통해 분석한 결과이다.
- [0063] 도 9와 같이 cortico-striatal circuit, 단일 회로에서 전기 자극을 주었을 때, 유입되는 칼슘을 유전자 칼슘 센서(PhySIN-GCaMP6f)로 확인하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 1 AP와 비교하여 10 AP에서는 약 10배 정도 증가된 칼슘 유입에 의한 형광 밝기가 측정되었다(10 AP : $\Delta F/F_0=7.17\pm0.82$, $N=10$, 1 AP: $\Delta F/F_0=0.54\pm0.10$, $N=10$). 여기서 N 은 샘플 수를 나타낸다.
- [0064] 도 11은 미세유체 장치에서 매우 짧은 간격(50 ms, 100 ms, 200 ms, 500ms)의 전기 자극에 따른 칼슘 다이내믹스를 유전자 칼슘 센서(PhySIN-GCaMP6f)로 측정된 결과이다. 도 11과 같이, 전기 자극 사이의 시간 간격이 길어질수록 $P2/P1$ 비율값(PPR)이 감소하는 것을 확인하였다(PPR ; 100 ms: 1.75 ± 0.08 , 200 ms: 1.51 ± 0.09 , 500 ms: 1.45 ± 0.12).
- [0065] 다음은 유전자 형광 센서를 통한 신경전달물질 방출량 변화 모니터링 방법에 관하여 설명한다.
- [0066] 본 발명의 실시예는, 각 채널 내의 세포에 대해 시냅스 트랜스미션(Synapse transmission) 분석을 위한 유전자 형광 센서를 부착한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 피질-선조체 회로의 신경전달물질 방출량 변화를 형광 현미경의 영상 촬영을 통하여 모니터링할 수 있다.
- [0067] 그 구체적인 실시예는 다음의 도 12 내지 도 16을 통하여 설명한다. 여기서 도 12 및 도 13, 도 14와 도 15는 서로 다른 유전자 형광 센서에 의한 실시예를 나타낸다.
- [0068] 먼저, 도 12는 본 발명의 실시예에 따른 미세유체 장치에서 배양된 전전두엽 피질 세포와 선조체 세포가 각 채널을 따라 성장하여 시냅스 챔버에서 결합하여 회로를 형성한 모습을 형광(synapto-pH)으로 나타낸 것이고, 도 13은 미세유체 장치에서 100 AP의 전기 자극에 따라 방출되는 신경전달물질을 유전자 형광 센서(synapto-pH) 반응을 통해 측정된 결과이다.
- [0069] 도 12와 같이 cortico-striatal circuit, 단일 회로에서 전기 자극을 주었을 때, 방출되는 신경전달물질을 유전자 형광 센서(synapto-pH)로 확인 하였다. 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 100 AP의 전기 자극에 따라 방출되는 신경전달물질을 유전자 형광 센서(synapto-pH)로 측정할 수 있었다(100 AP : $\Delta F/F_0=0.11\pm0.01$, $N=7$).
- [0070] 또한, synapto-pH이 아닌 다른 유전자 형광 센서(vGlut-pH)를 이용하여 실험을 진행하였다.
- [0071] 도 14는 본 발명의 실시예에 따라 생성한 뇌 신경 회로에 전기 자극을 주었을 때, 신경전달물질이 방출되는 생리학적 현상을 유전자 형광 센서(vGlut-pH) 반응을 통해 측정된 결과이고, 도 15는 미세유체 장치에서 50 AP, 100 AP, 300 AP의 각각 다른 강도의 전기 자극에 따라 방출되는 신경전달물질을 유전자 형광 센서(vGlut-pH) 반응을 통해 측정된 결과이다.
- [0072] 도 14와 같이 cortico-striatal circuit, 단일 회로에서 전기 자극을 주었을 때, 방출되는 신경전달물질을 유전자 형광 센서(vGlut-pH)로 확인 하였으며, 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 각 전기 자극의 세기가 50 AP,

100 AP, 300 AP로 강해질수록 증가된 신경전달물질 방출에 의한 형광 밝기가 측정되었다(50 AP : $\Delta F/F_0=0.51 \pm 0.12$, N=5, 100 AP : $\Delta F/F_0=0.68 \pm 0.14$, N=7, 300 AP : $\Delta F/F_0=1.03 \pm 0.20$, N=7).

[0073] 이상과 같이, PDMS 기반의 미세유체 장치에서 자극의 세기가 강해질수록 칼슘의 유입과 신경전달물질의 방출이 증가한다는 사실을 확인하였다. 이에 더하여, 방출되었던 시냅스 소낭이 다시 재활용(recycling)되는 시간 또한 측정 및 분석하였다.

[0074] 도 16은 본 발명의 실시예에 따른 미세유체 장치에서 전기 자극에 의해 방출된 시냅스 소낭이 다시 들어와 재활용(synapse retrieval)되는 시간을 측정한 결과이다. 도 16에 나타난 바와 같이 50 AP, 100 AP, 300 AP, 각 자극의 세기에서 방출되었던 시냅스 소낭이 재활용되는 시간은 형광 밝기의 감소를 분석하는 것을 통해 측정되었다(50 AP : 13.47 ± 1.50 초, N=5, 100 AP : 16.58 ± 2.89 초, N=7, 300 AP : 21.45 ± 3.10 초, N=7).

[0075] 이상과 같은 본 발명에 따르면, 미세유체장치 내에서 생체의 배양한 뇌 조직의 미세신경회로에 전기를 인가하여 전자기적 신경 활성을 유도하고 그에 따른 생리학적 특성 변화를 모니터링할 수 있다.

[0076] 전기활성에 따른 실시간 생리적 기능 모니터링에는 첫번째로 칼슘인자 분석을 위한 화학적, 유전적 칼슘 형광 센서를 부착하거나 발현한 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여, 전기 자극에 따른 피질-선조체 회로의 칼슘 수치 변화를 영상 촬영을 통하여 모니터링하는 과정을 포함한다. 두번째로 시냅스 트랜스미션을 분석을 위하여 유전적 시냅스 트랜스미션 형광센서(예: vGlut-pH, synapto-pH)를 발현상 상태에서 설정 조건의 전기 자극을 인가하여 전기 자극에 따른 상기 피질-선조체 회로의 시냅스 트랜스미션 변화를 영상 촬영을 통하여 모니터링하는 과정을 포함한다.

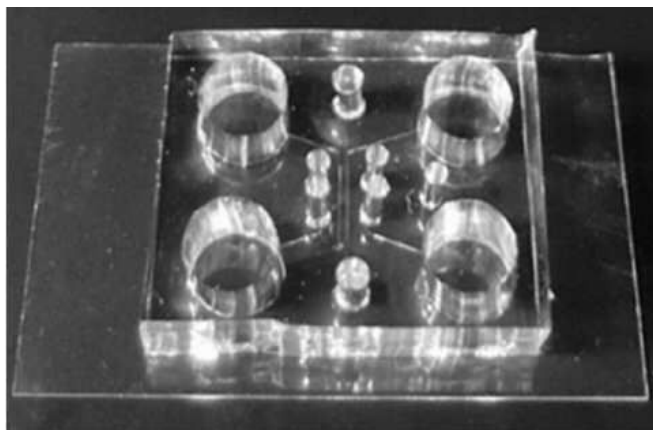
[0077] 본 발명에서는 전전두엽 피질과 선조체에서 각 다른 타입의 신경세포를 배양하여, in vitro 에서 단일 회로인 cortico-striatal circuit만을 형성하는 것을 확인하였고, 형성된 단일 회로에서 전기 자극에 의한 생리학적 기능 또한 형광 현미경을 통해 영상화 및 분석이 가능하므로, 본 미세유체 장치를 플랫폼으로 활용하는 경우 질환 모델 별로 어떠한 타입의 신경세포에서 어떠한 생리학적 특성이 변형되었는지 파악할 수 있다. 또한, 유전학적, 약리학적 접근 방식을 통해 변형된 특성을 회복시킬 수 있는 질환모델의 치료에도 활용이 가능하다.

[0078] 결과적으로, 본 발명은 목적으로 하는 뇌조직의 다양한 신경회로를 구조적으로 구성할 수 있을 뿐만 아니라 생리학적 기능을 관찰 할 수 있게 함으로써, 다양한 뇌신경 회로의 구조와 기능을 매우 정밀한 수준으로 관찰, 비교, 분석이 가능하며, 회로의 구조적 기능적 문제로 인한 뇌신경질환의 구조생리, 병태생리를 심도 있게 이해할 수 있도록 활용될 수 있다. 나아가, 질환 모델의 신경회로 구성을 통하여 다양한 약물 스크리닝(검색) 기법으로도 활용되어질 수 있다.

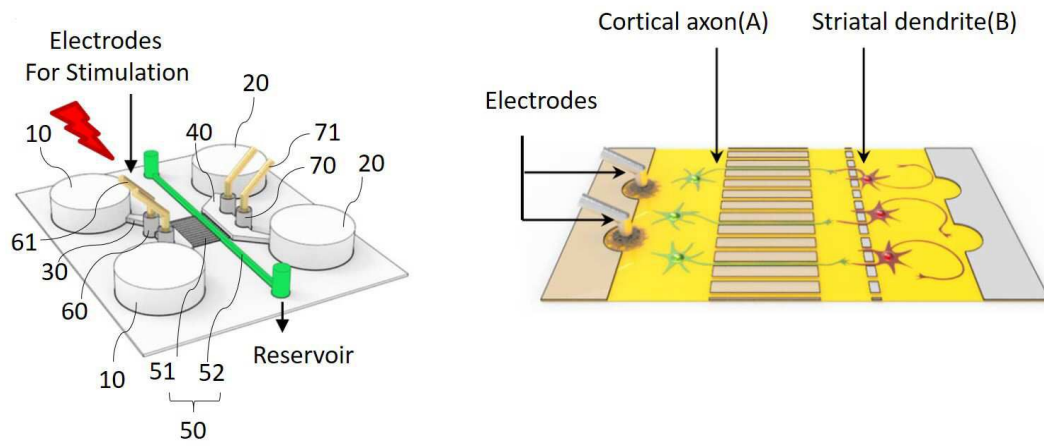
[0079] 본 발명은 도면에 도시된 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시 예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

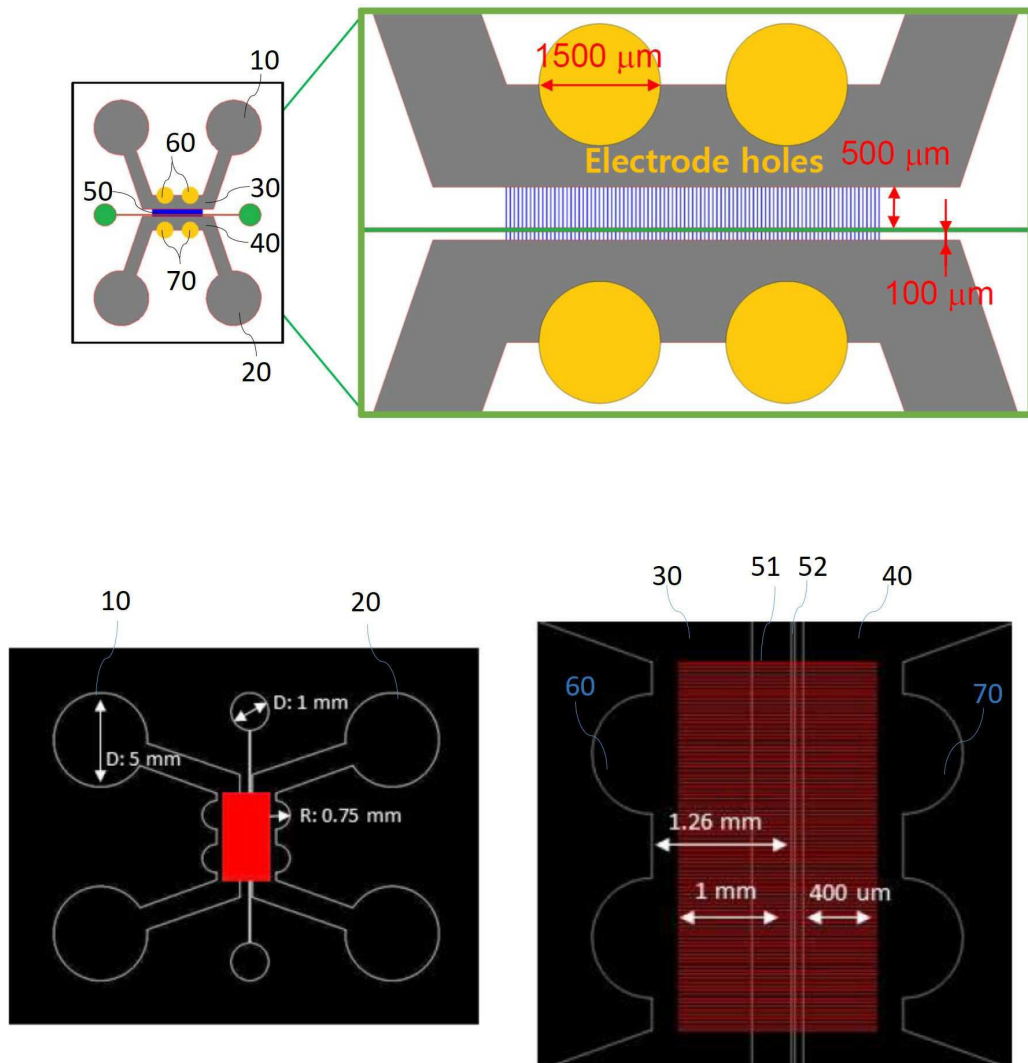
도면1



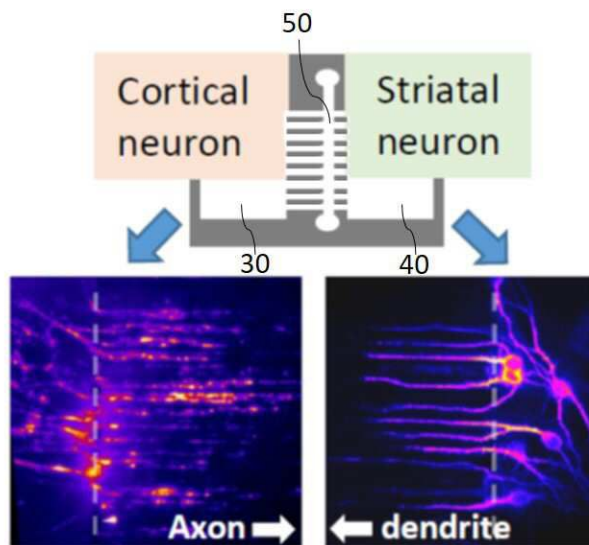
도면2a



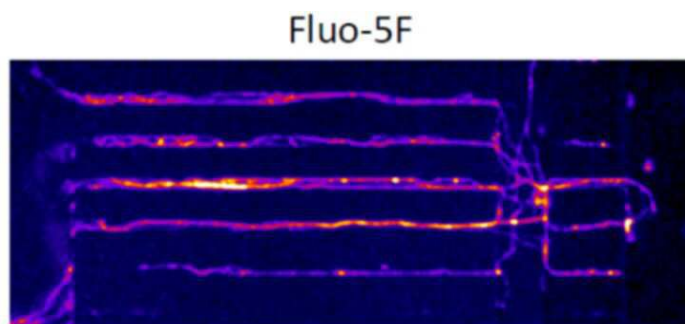
도면2b



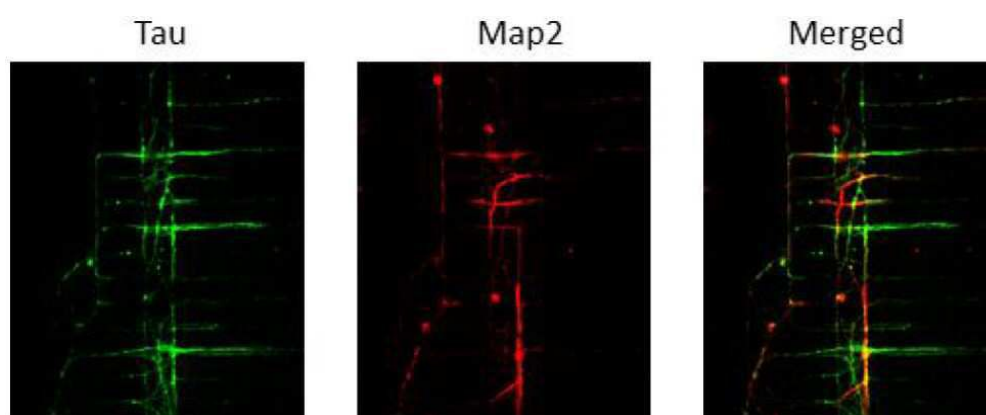
도면3a



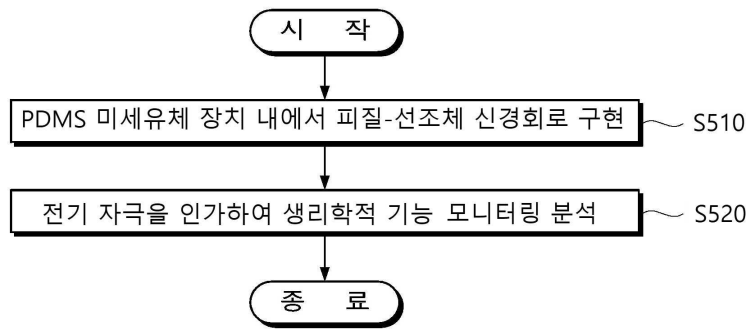
도면3b



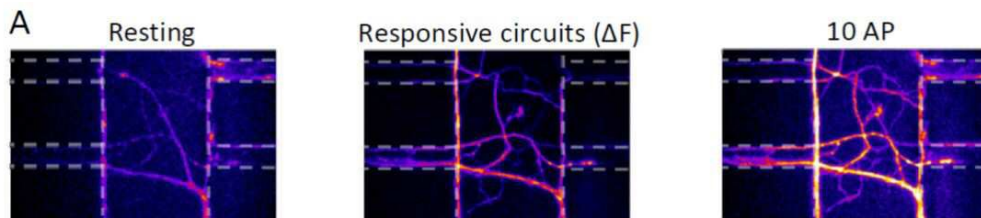
도면4



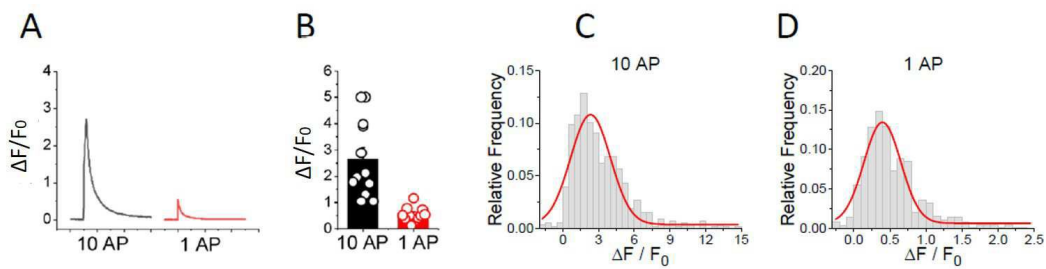
도면5



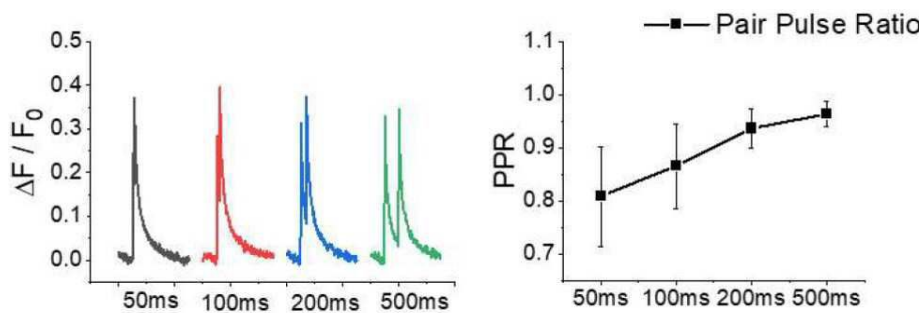
도면6



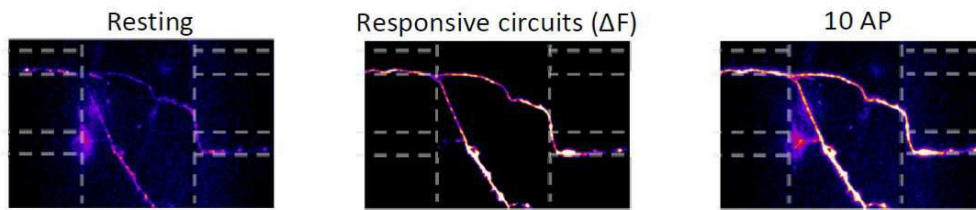
도면7



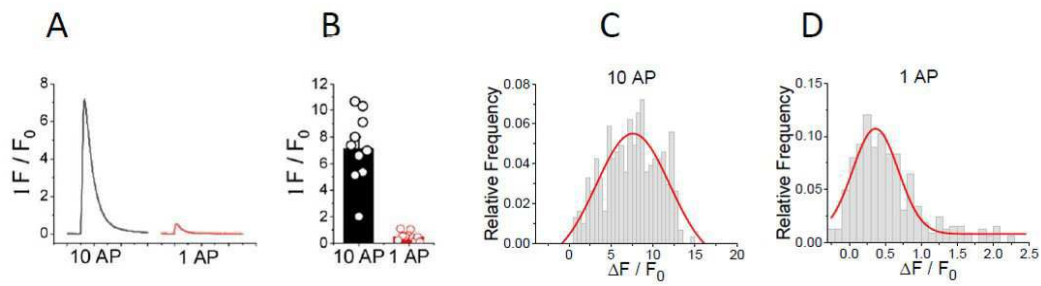
도면8



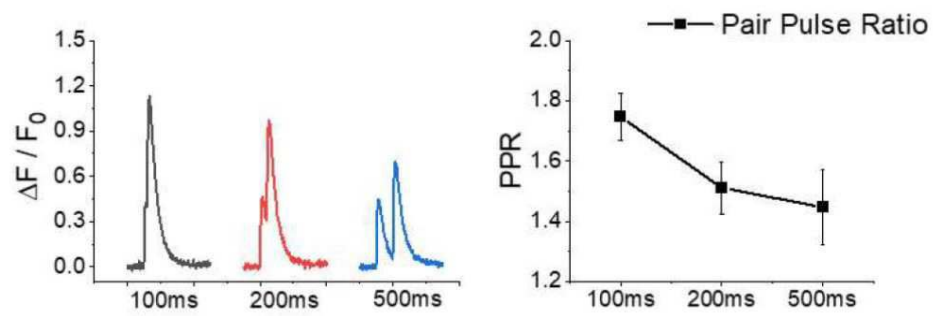
도면9



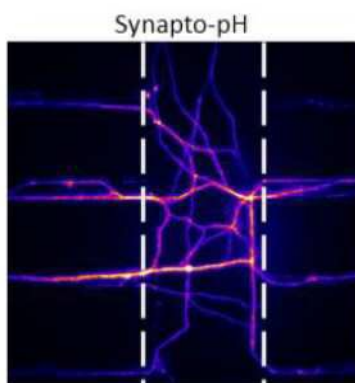
도면10



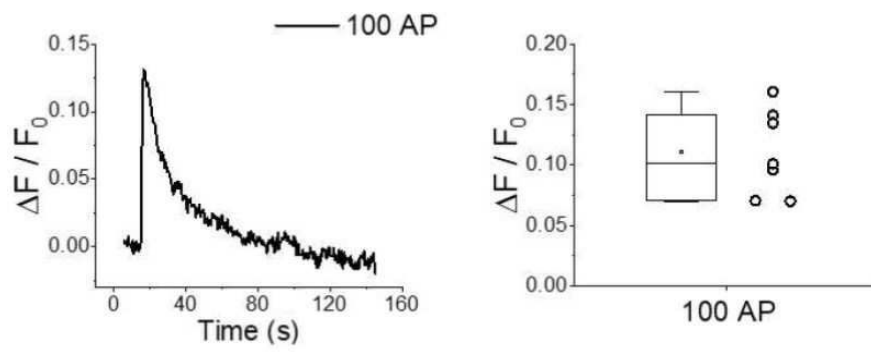
도면11



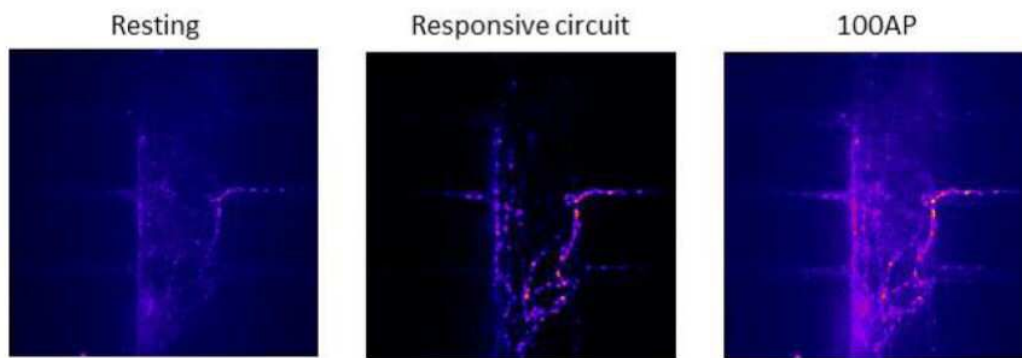
도면12



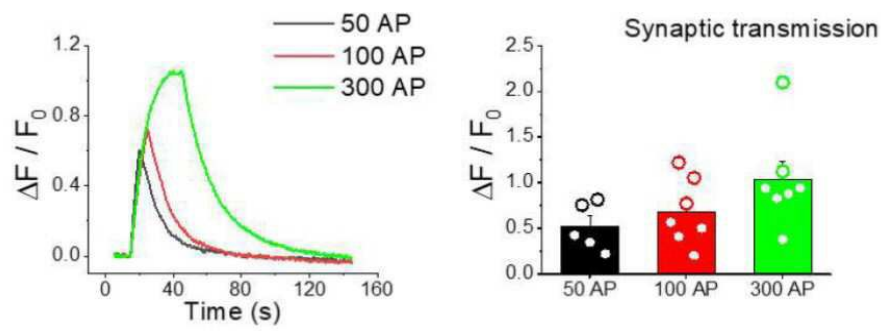
도면13



도면14



도면15



도면16

