

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 3월 1일 (01.03.2018)



(10) 국제공개번호
WO 2018/038391 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 5/077* (2010.01) *C12N 5/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/007285
- (22) 국제출원일: 2017년 7월 7일 (07.07.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0107023 2016년 8월 23일 (23.08.2016) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 임도선 (LIM, Do-Sun); 06281 서울시 강남구 선릉로 206, 101-204, Seoul (KR). 이규백 (LEE, Kyu

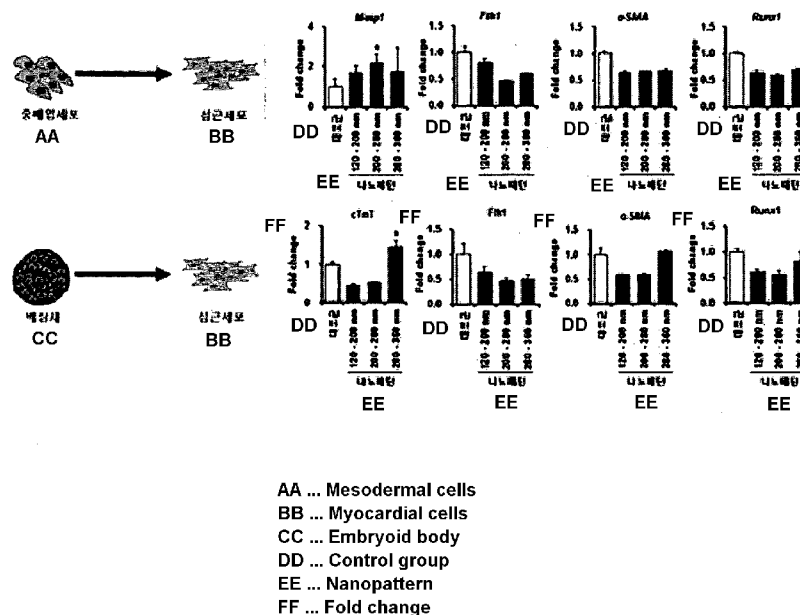
Back); 02831 서울시 성북구 성북로4길 52, 207-1101, Seoul (KR). 주형준 (JOO, Hyung Joon); 06289 서울시 강남구 선릉로 120, 12-1106, Seoul (KR). 서하림 (SEO, Ha-Rim); 50964 경상남도 김해시 흥동로 104, 303호, Gyeongsangnam-do (KR). 최룡휘 (CUI, Longhui); 05853 서울시 송파구 위례광장로 121, 2417-803, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 이치영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: METHOD FOR DIFFERENTIATING STEM CELLS INTO MYOCARDIAL CELLS BY USING NANOPATTERN

(54) 발명의 명칭: 나노패턴을 이용한 줄기세포의 심근세포로의 분화방법

[도8]



(57) Abstract: The present invention relates to a method for culturing stem cells in a nanopattern culture dish and differentiating the same into myocardial cells. More specifically, the present invention relates to a method for differentiating stem cells into myocardial cells by using a dual gradient nanopattern culture dish in which the diameter thereof constantly increases and the spacing thereof constantly decreases. According to the present invention, a method for differentiating stem cells into myocardial cells by using a nanopattern culture dish optimized for myocardial cells differentiation is economical because it is not necessary to coat an expensive extracellular matrix or use supporting cells, and is excellent in the efficiency of differentiation into myocardial cells.

[다음 쪽 계속]

WO 2018/038391 A1

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 줄기세포를 나노패턴 배양접시에 배양하여 심근세포로 분화시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 직경이 일정하게 증가하고 간격이 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴 배양접시를 이용하여 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 심근세포 분화에 최적화된 나노패턴 배양접시를 이용한 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법은 고가의 세포외 기질을 코팅하거나 지지세포를 이용할 필요 없어 경제적이며, 심근세포로의 분화 효율이 우수하다.

명세서

발명의 명칭: 나노패턴을 이용한 줄기세포의 심근세포로의 분화방법

기술분야

- [1] 본 발명은 줄기세포를 나노패턴 배양접시에 배양하여 심근세포로 분화시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 직경이 일정하게 증가하고 간격이 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴 배양접시를 이용하여 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 줄기세포란 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 미분화 세포로서 분화환경에 따라 특정 세포로 분화할 수 있기 때문에 난치병 예방 및 치료목적의 줄기세포 이용 가능성이 높아지고 있다. 서구화된 식습관, 운동부족 및 노년층의 증가로 인하여 전 세계적으로 급격히 증가하고 있는 급성 심근경색과 같은 난치성 심장질환자의 생존율은 난치성 심장질환 약물 및 중재 시술 증대 등의 의학기술 발달에 따라 소폭 증가추세에 있다. 하지만 아직까지 기존의 치료법으로는 손상된 심근의 재생을 요구하는 근본적인 세포치료가 전무한 실정이다. 특히 성숙한 심근세포는 증식률이 매우 미미하기 때문에 줄기세포로부터 분화를 유도하여 다량의 심근세포를 확보하는 과정이 필수적이다.
- [4] 나노 기술의 발전으로 다양한 나노표면 배양접시를 이용하여 줄기세포의 분화를 시도하고 있으나 대부분 특정 직경의 나노패턴이 포함된 배양접시를 이용한 연구결과가 보고되고 있다. 이러한 연구 결과는 줄기세포의 형태변화 관찰 및 신경세포로의 분화유도 (Z.Z. Wu *et al.*, *Biotechnol Bioeng.*, 1:106, 2010; L. Qi *et al.*, *PLoS One*, 8:3, 2013) 수준으로 현재, 심근세포의 분화를 위한 최적화된 나노 패턴의 연구가 미흡한 실정이다. 최근 연구결과에서 줄기세포로부터 심근세포 분화유도 방법이 제시된 바 있으나 (J.M Vilches *et al.*, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, 1:1, 2014; Z. Limor *et al.*, *Eur Heart J.*, 34:21, 2013) 이들 대부분은 배상체 (Embryoid body)를 형성한 후 일반 배양접시에 부착하여 분화를 유도하였기 때문에 분화 후 실질적인 심근세포의 수율이 전체 세포의 5% 미만으로 보고되었다. 또한, 외배엽 및 내배엽 세포에서 기원한 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있어서 분화세포 종류를 예측하는데 한계가 있었다. 뿐만 아니라 분화 유도한 세포집단을 그대로 생체에 이식하거나 치료에 이용하기 곤란하다는 문제가 있었다.
- [5] 이에, 본 발명자들은 줄기세포를 효율적으로 심근세포로 분화시키는 방법을 찾고자 예의 노력한 결과, 줄기세포로부터 분화 유도된 중배엽 세포 및 배상체를

직경은 일정하게 증가하고, 간격은 일정하게 감소하는 특정 구조의 나노패턴 배양접시에서 배양할 경우, 심근세포로 효율적으로 분화하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[6]

[7] **발명의 요약**

[8] 본 발명의 목적은 줄기세포에서 유도된 중배엽 세포 또는 배상체 (Embryoid body)를 나노 단위 (nm)의 높이 (Height)를 갖고, 직경 (Diameter)은 일정하게 증가하고, 간격 (Spacing)은 일정하게 감소하는 나노패턴 배양접시에 배양하여 심근세포로 분화시키는 방법을 제공하는데 있다.

[9]

[10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 줄기세포에서 유도된 중배엽 세포를 200 내지 500 nm의 높이; 120 내지 360 nm의 직경; 및 80 내지 240 nm의 간격의 나노패턴 배양접시에 배양하여 심근세포로 분화시키는 단계를 포함하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[11] 본 발명은 또한, 줄기세포에서 유도된 배상체를 200 내지 500 nm의 높이; 120 내지 360 nm의 직경; 및 80 내지 240 nm의 간격의 나노패턴 배양접시에 배양하여 심근세포로 분화시키는 단계를 포함하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[12]

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 나노패턴의 구조를 나타낸 것이다.

[14] 도 2의 (A)는 일반 배양접시 안에 부착된 나노패턴을 나타낸 것이고, (B)는 45° 기울여진 나노패턴의 주사전자현미경 사진이며 (스케일 바는 100 nm), (C)는 다양한 구배구조를 갖는 나노패턴의 주사전자현미경 이미지이다.

[15] 도 3의 (A)는 줄기세포 유래 중배엽 세포를 2일 또는 4일 동안 나노패턴 배양접시에서 배양 후 DAPI를 염색한 형광현미경 사진이고 (스케일 바는 50 μ m), (B) 및 (C)는 나노패턴 배양접시에서 4일 동안 배양한 줄기세포의 단위면적 당 세포 수 및 군집 형성 수를 비교한 결과이다. (D)는 Phospho histone 3 (PHH3)와 F-actin의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 것이고 (스케일 바는 50 μ m), (E)는 PHH3을 발현하는 세포의 비를 나타낸 것이다. (F)는 Cleaved caspase 3 (C-caspase 3)과 F-actin의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 것이고 (스케일 바는 50 μ m), (G)는 C-caspase 3을 발현하는 세포의 비를 나타낸 것이다.

[16] 도 4는 나노패턴 배양접시에서 2일 또는 4일 동안 배양한 줄기세포의 Mesp1, Flk1, α -SMA, Runx1 및 Gata2의 mRNA 수준을 비교한 결과이다.

[17] 도 5의 (A)는 나노패턴을 이용한 중배엽 세포의 심근세포로의 분화방법을 개략적으로 나타낸 것이고, (B)는 심근세포 분화 유도인자 복합물 처리 후 심근세포 분화양상을 형광현미경으로 확인한 것이며 (스케일 바는 50 μ m), (C),

(D) 및 (E)는 나노패턴 배양접시에서 분화 유도된 심근세포 군집 수, 심근세포 군집 면적 및 심근세포 군집의 군집둘레를 비교한 것이다.

[18] 도 6의 (A)는 나노패턴에서 배상체로부터 심근세포의 분화방법을 개략적으로 나타낸 것이며 (스케일 바는 100 μm), (B)는 대조군과 비교해서 나노패턴 배양접시에서 배양한 배상체의 구조적 형태 변화를 확인한 광학현미경 사진이고 (스케일 바는 200 μm), (C)는 대조군 및 나노패턴 배양접시에서 8일째 배양한 배상체의 심근세포로의 분화 양상을 확인한 형광 사진이며, (D)는 대조군 및 나노패턴 배양접시에서 12일째 배양한 배상체를 cTnT 염색 하여 근섬유분절을 형광현미경으로 확인한 것이다.

[19] 도 7은 심근세포로 분화를 위해 저분자 및 저해제를 처리한 후, (A)는 분화 유도된 줄기세포의 α -actinin의 발현을 확인한 형광사진이고 (스케일 바는 10 μm), (B)는 Connexin 43의 발현을 면역형광염색법으로 확인한 사진이며 (스케일 바는 25 μm), (C)는 4일 배양한 후 α -MHC, cTnT, cTnl 및 Nkx2.5의 발현을 mRNA 수준에서 비교한 결과이다.

[20] 도 8은 중배엽 세포 및 배상체로부터 각각 심근세포로의 분화 시, 나노패턴 직경에 따른 유전자 발현 양상을 중합효소연쇄반응으로 확인한 결과이다.

[21]

[22] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[23] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[24]

[25] 본 발명에서는 줄기세포를 중배엽 세포 또는 배상체로 분화를 유도한 후, 상기 중배엽 세포는 직경이 200 내지 280 nm로 일정하게 증가하고, 간격이 240 내지 160 nm로 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴 배양접시에서 분화유도인자가 포함된 배지를 사용하여 배양하고, 배상체는 직경이 280 내지 360 nm로 일정하게 증가하고, 간격이 160 내지 80 nm로 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴 배양접시에서 배양하면 심근세포로 분화가 효율적으로 유도된다는 것을 확인하였다.

[26] 따라서, 본 발명은 일관점에서, 줄기세포에서 유도된 중배엽 세포를 200 내지 500 nm의 높이; 120 내지 360 nm의 직경; 및 80 내지 240 nm의 간격의 나노패턴 배양접시에서 배양하여 심근세포로 분화시키는 단계를 포함하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

[27] 본 발명에 있어서, 상기 나노패턴의 직경은 200 내지 280 nm인 것이 바람직하며, 나노패턴의 간격은 160 내지 240 nm인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[28] 본 발명에 있어서, 상기 나노패턴은 직경이 일정하게 증가하고, 간격이

일정하게 감소하는 이중구배인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 구배를 가지지 않는 나노패턴을 사용하여도 무방하다.

- [29] 본 발명에 있어서, 중배엽 세포를 200 내지 500 nm의 높이를 갖고, 직경은 200 내지 280 nm로 일정하게 증가하고 간격은 240 내지 160 nm로 일정하게 감소하는 나노패턴 배양접시에서 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 본 발명에 있어서, 상기 중배엽 세포로 분화 유도는 10% (v/v) 소태아혈청 (Fetal bovine serum), 2 mM L-글루타민 (L-Glutamine), 50 Units/mL 페니실린 (Penicillin), 50 µg/mL 스트렙토마이신 (Streptomycin), 및 100 µM 베타-머캅토에탄올 (β -Mercaptoethanol)을 포함하는 α -MEM 배지에서 줄기세포를 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [31] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포의 중배엽 세포로의 분화는 4.5일 동안 유도하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [32] 본 발명에 있어서, 상기 분화 유도된 중배엽 세포는 항체를 이용하여 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [33] 본 발명의 일 실시예에서는 줄기세포를 중배엽 세포로 일차적 분화를 거친 후, 중배엽 세포만을 순수 분리하여 배양하였다. 중배엽 세포는 다분화능의 세포로써 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 혈액세포 및 심근세포로 분화가 가능하다. 또한 중배엽으로 이미 분화된 세포이기 때문에 외배엽 및 내배엽에서 기원되는 다른 세포로의 분화가 차단될 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 실시예에서는 중배엽 세포를 순수 분리하여 배양하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 특정 단백질 양성의 중배엽 세포만으로 한정되는 것은 아니며, 또한 단일의 세포 표면마커의 발현으로만 제한되는 것은 아니다.
- [35] 본 발명에 있어서, 상기 분화 유도된 중배엽 세포는 1×10^4 내지 2×10^4 세포/cm²로 접종하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [36] 본 발명에 있어서, 상기 중배엽 세포를 심근세포로 분화 유도 배양은 4일 동안 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명에서 "줄기세포 (Stem cell)"는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 미분화 세포들을 총칭하여 일컫는 말로서, 다양한 방법으로 분류할 수 있다. 그 중 가장 흔히 이용되는 방법 중 하나는 줄기세포의 분화능에 따른 것으로 만능 (Pluripotent) 줄기세포, 다분화능 (Multipotent) 줄기세포 및 단분화능 (Unipotent) 줄기세포로 나눌 수 있다.
- [38] 본 발명에서 "중배엽 (Mesoderm)"은 대부분의 다세포 동물의 초기 발생에서 외배엽과 내배엽의 사이에 존재하는 중간층을 지칭하며, 이후, 특이적으로 심장, 혈관, 근육, 뼈, 생식기관 및 몇몇의 분비관 등을 이루는 조직으로 분화가 이루어진다.
- [39] 본 발명에서 "분화 (Differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 특별한 기능을 갖는 특정한 세포나 조직의 복합체 또는 개체의 수준으로 변해가는 것을 말한다.

- [40]
- [41] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 줄기세포로부터 배상체를 형성시킨 후, 배상체를 나노패턴에서 심근세포로 분화 유도하였다.
- [42] 본 발명의 일 실시예에서는 현적배양 (Hanging drop culture) 법으로 배상체를 제작하여 심근세포로 분화를 유도하였으나, 세포 비부착성 배양접시를 사용하여 배상체를 배양하거나 또는 일반 배양접시 표면을 코팅하여 세포 부착을 저해하여 배상체를 배양하여도 무방하다.
- [43] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 줄기세포에서 유도된 배상체를 200 내지 500 nm의 높이; 120 내지 360 nm의 직경; 및 80 내지 240 nm의 간격의 나노패턴 배양접시에서 배양하여 심근세포로 분화시키는 단계를 포함하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.
- [44] 본 발명에 있어서, 상기 나노패턴의 직경은 280 내지 360 nm인 것이 바람직하며, 나노패턴의 간격은 80 내지 160 nm인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [45] 본 발명에 있어서, 상기 나노패턴은 직경이 일정하게 증가하고, 간격이 일정하게 감소하는 이중구배인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 구배를 가지지 않는 나노패턴을 사용하여도 무방하다.
- [46] 본 발명에 있어서, 배상체를 200 내지 500 nm의 높이를 갖고, 직경은 280 내지 360 nm로 일정하게 증가하고 간격은 160 내지 80 nm로 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴 배양접시에서 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명에 있어서, 상기 배상체로 분화 유도는 10% (v/v) 소태아혈청, 2 mM L-글루타민, 50 Units/mL 페니실린, 50 μ g/mL 스트렙토마이신, 및 100 μ M 베타-머캅토에탄올을 포함하는 α -MEM 배지에서 줄기세포를 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포를 배상체로의 분화는 2일간 유도하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [49] 본 발명의 배상체는 줄기세포들로 이루어진 구형체 세포 덩어리로서 중배엽 세포로의 자연적인 분화가 가능하기 때문에 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 혈액세포 및 심근세포의 분화를 유도할 수 있다.
- [50] 본 발명에 있어서, 배상체 한 개를 형성하는 줄기세포는 2×10^3 내지 4×10^3 개인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 3×10^3 개 줄기세포인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 배상체 제작 시에는 세포수를 한정하지 않으며 세포의 수를 조절하여 다양한 크기의 배상체를 제작할 수 있다.
- [51] 본 발명에 있어서, 상기 심근세포로의 분화는 나노패턴 배양접시에 배상체 10개를 부착시켜 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [52] 본 발명에 있어서, 상기 배상체를 심근세포로 분화시키기 위한 배양은 8일 동안 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[53]

[54] 줄기세포는 배양접시의 표면구조에 따라 부착 및 생장능이 달라지고 세포분화를 조절 받는다. 부착성 세포가 체외 배양시 접촉하는 배양접시의 표면이 나노 단위의 돌기가 있으며, 직경의 크기가 점점 작아지거나 커지는 구배패턴인 경우, 배양초기의 세포-기질 간 상호작용에 의해 줄기세포가 나노패턴 배양접시의 표면에 접촉하고 증식하여, 심근세포로의 분화능을 획득할 수 있다.

[55] 본 발명에 있어서, 나노패턴은 돌기형인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 패턴으로 될 수 있는 어떤 형태라도 사용 가능하다.

[56]

[57] 본 발명의 일 실시예에서는 가로 35 mm, 세로 20 mm의 면적 700 mm²을 가진 공간 내에 세포를 배양하였으나, 그 크기에 국한되지는 않는다.

[58] 본 발명에 있어서, 상기 나노패턴의 높이는 200 내지 500 nm인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[59] 본 발명에 따른 줄기세포 배양에 적합한 표면구조는 직경과 간격이 동시에 변화하는 나노패턴 배양접시를 이용하여 수행되는 것일 수 있다. 상기 직경과 간격이 동시에 변화하는 나노패턴이 균일하게 배열된 것을 "이중구배 나노패턴 (Dual gradient nanopattern)"이라 정의하였다. 상기 본 발명의 용어 "구배 (Gradient)"는 일정하고 규칙적인 변화를 의미한다. 상기 본 발명에 따른 일반 배양접시에 도입된 이중구배 나노패턴은 직경과 간격이 동시에 증가하거나, 직경과 간격이 동시에 감소하거나 또는 직경은 증가하되 간격은 감소하도록 제조된 것일 수 있다. 바람직하게 본 발명에서는 일정한 비율로 증가하는 나노패턴의 직경과 일정하게 감소하는 나노패턴 사이의 간격을 묘사하기 위하여 사용한다. 상기 나노패턴의 직경은 [도 1]에 나타난 것과 같이, 나노패턴의 상부를 유사한 크기의 원형으로 가정하여 측정되는 지름을 의미하며, 상기 나노패턴의 간격 역시 [도 1]에 나타난 것과 같이, 하나의 나노패턴과 가장 가깝게 이웃한 나노패턴의 거리를 측정한 값이 될 수 있다.

[60] 상기 직경이 증가하는 동시에 간격은 감소하는 이중구배 나노패턴은 산성용액에 대한 노출시간을 조절하여 일 말단으로부터 다른 말단으로 증가하는 직경을 갖는 나노다공성 기공을 포함하는 음이온성 산화알루미늄 (Anodic aluminium oxide)을 이용하여 제조할 수 있다. 본 제조기술은 한국특허출원 제10-2014-0129841호를 이용하였다. 상기 음이온성 산화알루미늄은 알루미늄판을 인산용액에서 양극산화처리하고 크롬산 용액으로 식각하여 제조되는 것일 수 있다. 결과로 생성된 정렬된 기공을 갖는 음이온성 산화알루미늄을 다시 양극산화처리하고 인산용액에 담금 시간을 점진적으로 증가시키면서 처리하여 기공의 직경이 일정하게 증가하는 음이온성 산화알루미늄 주형을 제작할 수 있다. 마지막으로, 상기 제조된 음이온성 산화알루미늄 주형을 폴리스티렌 등의 세포독성을 갖지 않아 세포 배양접시로

사용가능한 재질의 기판에 열각인 (Thermal imprinting)하여 제조할 수 있다. 상기 제조과정은 열각인 전에 음이온성 산화알루미늄 주형 상에 자기조립에 의해 HDFS (Heptadecafluoro- 1,1,2,2-tetrahydrodecyl trichlorosilane) 단일층을 코팅하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 기공크기가 일정하게 증가하는 음이온성 산화알루미늄 주형을 제조하기 위한 인산용액에 담금 시간은 바람직하게 0분으로부터 500분까지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[61] 상기 제조한 직경이 일정하게 증가하는 기공을 포함하는 음이온성 산화알루미늄을 열각인하여 나노패턴을 제조하기 위한 기판은 본 발명의 목적상 세포배양을 목적으로 하는 것이므로, 바람직하게 세포독성을 나타내지 않는 생체적합성 고분자 재질로 제조되는 것일 수 있다. 바람직하게 일반적으로 세포배양에 사용되는 일반 배양접시의 재질인 폴리스티렌 재질일 수 있으며, 상용화되는 폴리스티렌 세포 배양접시를 직접 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 폴리스티렌 기판을 사용하는 경우 열각인은 기판을 100 내지 150°C에서 7 내지 13분간 가열하고 2.5 내지 3.5 바 (bar)로 80 내지 120초간 압축하여 수행될 수 있다.

[62] 본 발명에서 “나노패턴 (Nanopattern)”은 나노 단위의 돌기가 균일하게 배열되어 있는 것을 말하며, 줄기세포능을 갖는 줄기세포를 지속적으로 배양하기 위한 목적으로 제작하였다. 나노패턴은 체내 조직표면의 굴곡을 생체 외에서 모사한 것으로써, 세포 배양 시 부착표면에서의 세포 형태변화가 세포의 특성 및 분화에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명의 나노패턴은 심근세포 분화에 적합한 최적의 표면형태를 선별하여, 다른 성격의 세포분화를 감소시키는 동시에 심근세포로의 분화를 증진시킬 수 있다.

[63] 생체의 세포표면을 모사한 나노패턴에 세포가 부착하는 방법으로는 세포외 기질 구성성분을 매개로한 세포부착과 정전기적 세포부착으로 구분 지을 수 있다. 세포외 기질을 구성성분을 매개로한 세포부착에서는 콜라겐 (Collagen), 피브로넥틴 (Fibronectin), 라미닌 (Laminin) 및 젤라틴 (Gelatin) 등을 코팅하여 상기 세포외 기질 구성성분에 존재하는 특정 단백질 리간드를 인지할 수 있는 세포막 내 인테그린과 결합하여 부착이 가능하다. 정전기적 세포부착은 세포막의 구성성분인 인지질에 의해 전기적으로 음성을 띠게 되므로, 전기적으로 양성인 세포표면을 제작하여 막의 전기적 성질에 의해 세포의 부착을 유도하는 방법이다. 통상적으로 사용되고 있는 대부분의 일반 배양접시는 정전기적 세포부착 원리를 이용하여 제작되고 있으며, 양성의 전기적 표면을 제작하기 위해 일반 배양접시 표면에 플라즈마 처리를 한다.

[64] 상기 본 발명의 용어 “부착성 (Adhesive)”은 세포가 세포 부착 분자 (Cell adhesion molecule)을 통해 표면, 세포외 기질 또는 다른 세포에 결합하는 성질을 의미한다. 적절한 세포 부착성은 다세포구조 (Multicellular structure)의 유지에 필수적인 특성이다. 상기 세포부착성은 세포의 세포질을 연결할 수 있으며 신호전달에 관여할 수 있다.

- [65] 본 발명의 나노패턴 배양접시는 세포의 부착배양을 용이하게 하기 위해 당업계에 알려진 코팅물질을 코팅하여 이용할 수 있다. 바람직하게 상기 코팅물질은 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌, 젤라틴, 알긴산염 (Alginate), 폴리-D-라이신 또는 한천 (Agar)일 수 있으나, 세포독성을 나타내지 않으면서 배양접시에 대한 세포 부착능을 향상시킬 수 있는 물질이면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [66] 본 발명의 줄기세포의 심근세포로의 분화는 일반 배양접시 표면에 나노패턴을 도입하고, 플라즈마 처리를 하여 전기적 양성을 띠는 세포 배양접시를 제작하여 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 나노패턴 배양접시는 사용하기 전 0.1% 젤라틴 코팅을 통해 세포막 내 인테그린이 배양접시 표면을 인지할 수 있도록 제작하는 것이 바람직하나, 처리한 물질이 세포 사멸을 유도시키지 않는 코팅물질이라면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [67] 본 발명에 있어서, 줄기세포는 만능 줄기세포인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 배아 줄기세포인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 10% (v/v) 혈청 대체물 (Knockout serum replacement), 100 μ M 베타-머캅토에탄올, 1% (v/v) 비필수 아미노산 (Non-essential amino acid), 1 mM 피루빈산나트륨 (Sodium pyruvate), 1% (v/v) 소태아혈청, 50 Units/mL 페니실린, 50 μ g/mL 스트렙토마이신, 2000 Units/mL 백혈구억제인자 (Leukemia inhibitory factor), 100 μ g/mL 블라스티시딘 (Blasticidin) 및 100 μ g/mL 제네티신 (Geneticin)을 포함하는 GMEM 배지에서 배양한 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [69] 또한, 상기 줄기세포는 0.1% 젤라틴으로 코팅한 일반 배양접시에서 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [70] 본 발명에 있어서, 중배엽 세포로부터 심근세포로의 분화 시 소태아혈청, L-글루타민, 페니실린, 스트렙토마이신, 베타-머캅토에탄올 및 심근세포 유도인자 복합물이 포함된 α -MEM 배지에서 줄기세포를 배양하는 것이 바람직하며, 이러한 심근세포 분화 배지에는 심근세포 유도인자로 면역억제제인 사이클로스포린 에이 (Cyclosporin A) 등이 포함될 수 있다. 사이클로스포린 에이는 심근전구세포에 단독 처리 시 심근세포로의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [71] 본 발명의 일 실시예에서는 심근세포 유도인자를 복합하여 처리하였으나, 기존에 심근세포 분화에 알려진 유도인자만의 혼합으로 제한되지 않으며, 처리 물질이 세포 사멸을 유도하지 않고 동시에 심근세포로 분화 가능하다면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [72] 본 발명은 나노패턴과 심근세포 분화 배지에 의한 시너지효과를 통해 효율적으로 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 줄기세포로부터 근섬유분절 (Sarcomere)이 형성된 심근세포로 분화하는 과정에서 세포학적 특성 변화를 비교분석하고, 그 결과를 통해

심근세포로의 분화 가능성을 유전자 발현차이로 확인하여 나노패턴 배양접시에서 심근세포 분화 배지 내 줄기세포의 심근세포 분화율을 비교분석함과 동시에 성숙도를 평가하였다.

[73] 나노패턴 배양접시에서 배양된 줄기세포의 세포학적 및 형태학적 특성 분석은 특성에 맞는 마커들의 유전자 발현을 중합효소연쇄반응을 통해서 수행하거나 마커 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 면역형광염색법을 통하여 수행할 수 있다.

[74] 상기 유전자 발현은 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 혈액세포 및 심근세포 특이적인 유전자 예컨대, 혈관내피세포의 마커로 Flk1, 혈관평활근세포의 마커로 α -SMA, 혈액세포의 마커로 Runx1 및 Gata2, 그리고 심근세포의 마커로 Mesp1 및 cTnT의 발현 차이로 확인 가능하다. 본 발명의 실시예는 상기 마커로 세포의 유전자발현 차이를 확인하였으나, 각 세포의 특성이 이들 마커로만 한정되는 것은 아니다.

[75] 또한, 상기 면역형광염색법을 수행함에 있어 두 개 이상 서로 다른 파장의 형광물질을 염색하였을 경우 동시에 검출할 수 있으며, 세포핵 속 DNA를 염색하는 DAPI를 이용하여 세포의 위치 및 수를 확인할 수 있다. 본 발명의 나노패턴 배양접시에서 배양된 세포는 광학현미경으로 관찰하였을 때 세포의 유무를 확인하기 어려우므로, 상기 DAPI는 목적상 세포의 위치를 가늠하기 위해 사용할 수 있으며, 염색용액을 상기 물질로만 한정하는 것은 아니다.

[76] 나노패턴에서의 줄기세포 배양은 심근세포로의 분화능을 획득할 수는 있지만 이것이 성숙한 세포로의 완전한 매개체는 될 수 없다. 줄기세포의 분화는 전분화능에서 다분화능으로, 다시 다분화능에서 분화능이 없는 성숙한 세포의 단계로 이루어진다. 각 분화가 일어나는 단계에서는 특정 성장인자들에 의한 신호전달이 일어나며, 이것이 분화단계의 전체를 아우르지 않는다. 따라서 나노패턴과 기존의 심근세포 분화에 알려진 유도인자의 시너지효과로 인해 심근세포로 분화시킬 수 있으며, 심근세포 분화 배지 내에 줄기세포로부터 심근세포로의 분화율을 확인할 수 있다. 상기 분화한 심근세포의 성숙도 분석은 심근세포 특이적인 마커의 발현을 측정함으로써 수행될 수 있다. 이러한 심근세포의 마커는 α -actinin, Connexin 43, α -MHC, cTnT, cTnI, Nkx2.5인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다

[77]

[78] 실시예

[79] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[80]

[81] 실시예 1: 줄기세포 및 나노패턴 배양접시

[82] 1-1: 줄기세포의 배양

[83] 줄기세포는 일본 교토대학교 Jun K. Yamashita로부터 분양받은 EMG7 마우스유래 배아 줄기세포를 사용하였으며, 상기 EMG7 마우스유래 배아 줄기세포는 알파-미오신 중쇄 (α -Myosin heavy chain; α -MHC) 프로모터가 활성화되면 eGFP (Enhanced green fluorescence protein)이 발현되는 세포주이다. 이 EMG7 세포를 0.1% 젤라틴으로 코팅한 일반 배양접시에서, 10% (v/v) 혈청 대체물 (Knockout serum replacement), 100 μ M 베타-머캅토에탄올 (β -Mercaptoethanol), 1% (v/v) 비필수 아미노산 (Non-essential amino acid), 1 mM 피루빈산나트륨 (Sodium pyruvate), 1%(v/v) 소태아혈청 (Fetal bovine serum), 50 Units/mL 페니실린 (Penicillin), 50 μ g/mL 스트렙토마이신 (Streptomycin), 2000 Units/mL 백혈구억제인자 (Leukemia inhibitory factor), 100 μ g/mL 블라스티시딘 (Blasticidin) 및 100 μ g/mL 제네티신 (Geneticin)을 포함하는 GMEM 배지로 배양하여 준비하였다.

[84]

[85] 1-2: 나노패턴 배양접시

[86] 나노 임프린트 기술 (Nanoimprint technology) (한국특허출원 제10-2014-0129841호)을 이용하여, 이전에 제시된 나노패턴의 직경보다 작은 범위의 직경으로 나노패턴 배양접시를 제작하였다.

[87] 초고순도 알루미늄판 (Ultrapure aluminum plates)을 과염소산용액 (Perchloric acid:absolute ethanol=1:4)으로 7°C에서 20V 전압을 이용하여 전기화학적으로 세척하였다. 상기 세척한 알루미늄판을 0°C에서 12시간 동안 193V 전압을 적용하여 인산용액 (DI water:methanol:phosphoric acid=59:40:1)으로 양극산화처리 (Anodizing)하고, 크롬산용액 (9 g chromic acid 및 20.3 mL phosphoric acid가 포함된 500 mL DI water)으로 식각 (Etching)하였다. 상기 제조된 잘 정렬된 기공을 포함하는 음이온성 산화알루미늄 (Anodic aluminum oxide)을 다시 4시간 동안 동일한 조건으로 양극산화처리하고 장력계 (Tensiometer; Operating speed 1.0 mm/min)를 이용하여 인산용액에 처리하되, 담금 (Dipping) 시간을 점진적으로 증가시키면서 강도를 조절하였다. 조절된 구배 기공을 포함하는 음이온성 산화알루미늄 주형을 자기조립된 HDFS (Heptadecafluoro-1,1,2,2- tetrahydrodecyl trichlorosilane) 단일층으로 코팅하였다. 음이온성 산화알루미늄의 표면을 먼저 피라냐 용액 (Piranha solution; 35% H_2SO_4 : H_2O_2 =7:3, v/v)으로 수산화하고 3 mM 무수 (Water-free) HDFS n-헥산용액을 이용하여 표면상에 HDFS 자기조립 단일층이 형성되도록 하였다. 나노각인장치, NANOSIS™ 610를 사용하여 나노미터 단위의 구배 직경을 갖는 기공을 포함하는 음이온성 산화알루미늄 주형을 열각인 (Thermally imprinting)시켜 폴리스티렌 (Polystyrene) 나노패턴 배양접시를 제조하였다. 700 mm² (35 mm×20 mm) 크기의 폴리스티렌 고분자 시트를 165°C에서 10분간 가열하고 3 바 (bar)로 120초간 압축하였다. 실온으로 온도를 낮춘 후 폴리스티렌 시트로부터 음이온성

산화알루미늄 주형을 분리하였다.

- [88] 나노패턴 제조를 위하여, 인산에서 2 단계 양극산화에 의해 패턴의 규칙적인 어레이를 포함하는 음이온성 산화알루미늄을 제조하였다. 30°C에서 패턴 확장을 위해 인산용액에서 담금 시간을 0분으로부터 350분까지 서서히 증가시킴으로써 나노미터 규격의 패턴 구배를 갖는 음이온성 산화알루미늄을 획득하였다.

음이온성 산화알루미늄에서 패턴의 직경은 담금 시간이 증가함에 따라 선형적으로 증가하였고, 변화하는 직경의 나노패턴을 갖는 폴리스티렌 표면 패턴화는 이중구배 나노패턴을 가지는 음이온성 산화알루미늄 주형의 열 나노각인에 의해 수행되었다. 상용되는 세포 배양접시에 가장 널리 사용되는 물질인 폴리스티렌을 바닥소재로써 선택하였다.

- [89] 그 결과, 나노패턴의 높이는 평균 200 내지 500 nm으로 하여, 나노패턴의 직경 및 간격을 다양하게 나노패턴을 제작하였다 (도 1). 즉, 나노패턴의 직경이 200 내지 280 nm 또는 280 내지 360 nm로 일정하게 증가하고, 간격이 240 내지 160 nm 또는 160 내지 80 nm로 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴을 제작하였다 (도 2C). 제작된 이중구배 나노패턴은 가로 35 mm 및 세로 20 mm로 면적 700 mm²의 기관 형태로 직경 60 mm의 일반 배양접시 안에 도입하여 사용하였다 (도 2A).

[90]

- [91] 실시예 2: 줄기세포 유래 중배엽 세포

- [92] 2-1: 중배엽 세포로의 분화 유도

- [93] 실시예 1-1에서 배양한 EMG7 세포를 인산염완충식염수 (Phosphate buffer saline; PBS)로 세척한 후, 0.25% 트립신/이디티에이

(Trypsin/Ethylenediaminetetraacetic acid; T/E)를 첨가하여 37°C 배양기에서 1분 동안 반응하여 세포를 탈착하였다. 세포를 수거하여 1000 rpm에서 3분 30초 동안 원심분리한 후, 상층액을 버리고 펠렛 (Pellet)을 상기 실시예 1-1에서 사용한 EMG7 배양 배지에 부유시켜 2×10³개/cm²의 세포를 0.1% 젤라틴으로 코팅한 배양접시에 분주하였다. 그 다음, 분화 배지인 10% (v/v) FBS, 2 mM L-글루타민, 50 Units/mL 페니실린, 50 µg/mL 스트렙토마이신 및 100 µM 베타-머캅토에탄올을 포함하는 α-MEM 배지를 사용하여 분화유도 하였다. 4.5일 동안 2일마다 배지를 교체하면서 배양하여 줄기세포를 중배엽 세포로 분화 유도하였다.

[94]

- [95] 2-2: 중배엽 세포의 분리

- [96] 4.5일 동안 분화 유도한 세포를 인산염완충식염수로 세척한 후, 0.25% 트립신/이디티에이를 첨가하여 37°C 배양기에서 2분간 반응하여 세포를 탈착하였다. 1000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 분화 배지를 첨가하여 재 부유시킨 세포를 37°C 배양기에서 30분간 안정화하였다. 1000 rpm에서 5분간 다시 원심분리한 후 펠렛은 Flk1 1차 항체를 포함하는

차단용액으로 4°C에서 20분 동안 반응시켰다. 그 다음, 인산염완충식염수로 1회 세척하여 스트렙타비딘 (Streptavidin) 또는 바이오틴 (Biotin) 마이크로비드 2차 항체를 4°C에서 30분 동안 처리한 후, 인산염완충식염수로 1회 세척하여 자동 자성활성 세포 분류기 (Auto magnetic-activated cell sorting; Auto MACS) 장비를 이용하여 중배엽 세포만을 순수 분리하였다.

[97]

[98] 실시예 3: 나노패턴 배양접시에서 분화 유도된 줄기세포의 특성

[99] 실시예 2에서 분리한 분화 유도된 줄기세포의 성장 특성을 확인하기 위해, 대조군으로서 일반 배양접시와 나노패턴 배양접시에서 중배엽 세포를 배양하였다.

[100] 실시예 2의 분화 배지를 사용하여, 대조군 및 나노패턴 배양접시에서 4일 동안 중배엽 세포를 배양하였다. 이후, DAPI로 염색하여 광학 및 형광현미경으로 형태를 관찰하였으며, 배양 4일 후에 단위면적 당 세포 수, 군집 형성 수를 분석하였다. 또한, Phospho histone 3 (PHH3) 및 Cleaved caspase 3 (C-caspase 3)를 측정하였으며, 마지막으로, 중배엽 세포를 나노패턴 배양접시에서 배양하여 분화 유도된 줄기세포가 발현하는 유전자에 대한 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

[101] 그 결과, 나노패턴 배양접시에서 배양된 중배엽 세포 수가 대조군에 비해서 증가한 것을 확인할 수 있었으며 (도 3A 및 도 3B), 나노패턴 배양접시에서 배양하여 분화 유도된 줄기세포의 군집 형성률이 3배 이상 증가한 것을 알 수 있었다 (도 3C).

[102] 이와 더불어, PHH3 및 C-caspase 3의 발현을 면역형광염색법을 통하여 확인한 결과, 나노패턴 배양접시에서 배양된 중배엽 세포에서 PHH3 양성세포가 증가한 것을 알 수 있었다 (도 3D 및 도 3E). 반면, 대조군과 나노패턴 배양접시에서 배양된 중배엽 세포에서 C-caspase 3 양성 세포의 수는 유사한 것으로 확인되었다 (도 3F 및 도 3G).

[103] 또한, 나노패턴 배양접시에서 2일 또는 4일 배양된 중배엽 세포의 심근세포, 혈관내피세포, 평활근세포 및 혈액세포 마커들인 *Mesp1*, *Flk1*, α -SMA, *Runx1* 및 *Gata2*의 mRNA 수준을 비교한 결과, 나노패턴 배양접시에서 분화된 세포에서 심근세포 마커인 *Mesp1*의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 4).

[104]

[105] 실시예 4: 나노패턴을 이용한 중배엽 세포의 심근세포로의 분화

[106] 실시예 2에서 분리한 알파-미오신 중쇄 프로모터에 eGFP이 발현하도록 제작된 줄기세포 유래 중배엽 세포를 분화 배지 내에 심근세포 유도인자 복합물을 첨가하여 심근세포로의 분화를 유도하였다. 대조군 및 나노패턴 배양접시를 0.1% 젤라틴으로 코팅한 후 60 mm 직경의 공간 당 1.43×10^4 세포/cm² 즉, 총 3×10^5 개의 중배엽 세포를 분주하고, 분화 배지 내에서 4일 동안 배양하였다 (도 5A). 심근세포 분화양상을 확인하기 위해 대조군 및 나노패턴 배양접시에서

심근세포 유도인자 복합물이 첨가된 분화 배지에 배양한 줄기세포를 DAPI로 염색하여 광학 및 형광현미경 이미지를 실시간으로 관찰하였다. Image J 소프트웨어를 사용하여 대조군 및 나노패턴 배양접시에 분화된 심근세포 수, 군집 수, 군집 면적 및 군집 둘레를 비교분석하여 그래프로 나타내었다.

- [107] 그 결과, 배양 2일째부터 eGFP 양성인 심근세포가 발견되며, 군집형태를 이루어 박동하는 성숙한 심근세포를 확인할 수 있었다. 특히 나노패턴 배양접시에서 배양하였을 경우 심근세포 군집 수가 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5B). 또한, 대조군에 비해 나노패턴 배양접시에서 분화된 심근세포 군집 면적이 세 배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 분화된 심근세포의 군집둘레는 두 배 이상 증가한 결과를 확인할 수 있었다 (도 5C, 5D 및 5E).

[108]

- [109] 실시예 5: 배상체 (Embryoid body)의 심근세포로의 분화

[110] 5-1: 줄기세포 유래 배상체

- [111] 실시예 1의 EMG7 세포를 기존에 보고된 현적배양 (Hanging drop culture)법에 따라 배상체를 형성시켰다. 구체적으로, 3×10^3 개의 EMG7 세포를 10% (v/v) 소태아혈청, 1% L-글루타민, 100 μ M 베타-머캅토에탄올, 50 Units/mL 페니실린, 50 μ g/mL 스트렙토마이신을 포함하는 20 μ l의 α -MEM 배지를 이용한 현적배양법으로 2일간 배양하여 배상체로 분화 유도하였다.

[112]

- [113] 5-2: 나노패턴을 이용한 배상체의 심근세포로의 분화

- [114] 알파-미오신 중쇄 프로모터의 활성화 시 eGFP가 발현하도록 제작된 줄기세포 유래 배상체를 0.1% 젤라틴으로 코팅한 대조군과 나노패턴 배양접시에 각각 10개씩 부착하여 배양하였다. 배양 하루 뒤 배상체가 배양접시에 부착된 것을 확인한 다음, 8일 동안 2일마다 배지를 교체하면서 배양하여 배양체를 심근세포로 분화 유도하였다 (도 6A). 또한, 나노패턴 배양접시에서 배상체의 구조적 형태 변화를 배양 1, 2, 4, 6 및 8일째까지 광학현미경으로 기록하였다 (도 6B). 나노패턴 배양접시에서 배양된 배상체의 심근세포로 분화양상을 확인하기 위해 배양 8일째 eGFP 양성의 심근세포를 DAPI 염색을 통하여 형광이미지로 분석하였다.

- [115] 그 결과, 배양 6일째부터 군집형태를 이루어 박동하는 성숙된 심근세포를 확인할 수 있었고, 배양 8일째 나노패턴 배양접시에서 배양한 배상체에서 심근세포 마커인 eGFP 발현이 대조군보다 증가한 것을 공초점 레이저 주사 현미경으로 확인할 수 있었다 (도 6C). 또한, 배양 12일째 대조군과 나노패턴 배양접시에서 분화된 심근세포에서 eGFP와 cTnT의 발현을 공초점 레이저 주사 현미경으로 확인하여 분화한 심근세포에서 근섬유분절을 관찰할 수 있었다. 즉, 나노패턴 배양접시에서 배양된 배상체는 심근세포로 분화 가능함을 확인할 수 있었다 (도 6D).

[116]

[117] 실시예 6: 심근세포 분화에서 분화 유도인자 처리의 영향

[118] 나노패턴 배양접시에서 분화 유도인자 처리에 의해 분화 유도된 심근세포의 세포학적 특성 변화를 분석하여, 성숙도를 평가하였다. 심근세포의 성숙도는 심근세포 특이적인 마커인 α -actinin, Connexin 43, α -MHC, cTnT, cTnI, Nkx2.5를 면역형광염색법 및 중합효소연쇄반응으로 측정하였다.

[119] 그 결과, 심근세포 특이적인 마커가 모두 발현 증가한 것을 확인하고, 나노패턴과 심근세포 분화 유도인자의 시너지효과로 인해 심근세포로의 분화 효율이 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다 (도 7).

[120] 또한, 실시예 2 및 5의 중배엽 세포 및 배상체를 다양한 직경과 간격을 갖고 있는 나노패턴 배양접시에서 배양하여 심근세포로 분화 유도하였으며, 상기 중배엽 세포는 심근세포 분화에 알려진 유도인자를 첨가한 분화 배지를 사용하였다. 분화한 심근세포는 심근세포 특이적인 마커의 발현을 측정하여 성숙도를 분석하였다.

[121] 그 결과, 심근세포 특이적 마커인 Mesp1 및 cTnT의 mRNA 발현이 증가한 것을 알 수 있었으며, 특히 중배엽 세포에서는 직경 200 내지 280 nm의 나노패턴에서 Mesp1의 발현이 가장 높았고, 배상체에서는 직경 280 내지 360 nm의 나노패턴에서 cTnT의 발현이 가장 높은 것을 알 수 있었다 (도 8).

[122]

산업상 이용가능성

[123] 본 발명에 따르면, 심근세포 분화에 최적화된 나노패턴을 이용하여 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법은 고가의 세포외 기질을 코팅하거나 지지세포를 이용할 필요가 없어 경제적이며, 나노패턴 위에 세포를 배양하는 단순한 방법으로 심근세포 분화를 유도하는 장점이 있다. 또한 심근세포로의 분화 효율이 우수하다.

[124]

[125] 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.

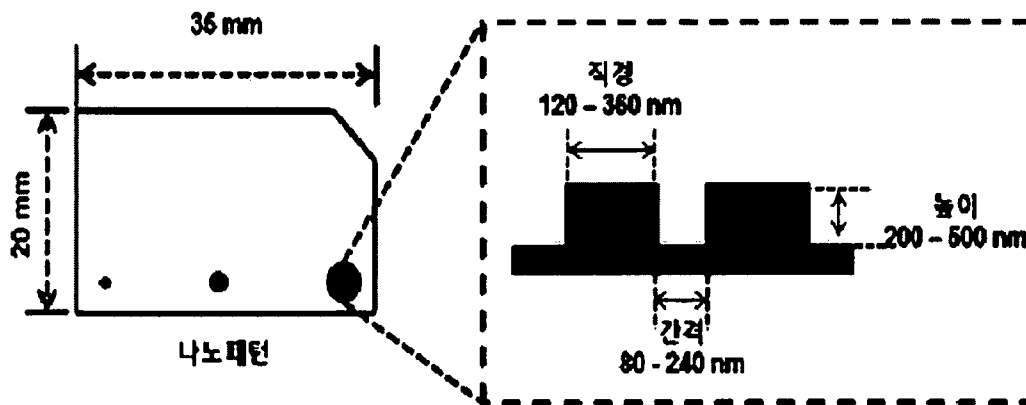
청구범위

- [청구항 1] 줄기세포에서 유도된 중배엽 세포를 200 내지 500 nm의 높이 (Height); 120 내지 360 nm의 직경 (Diameter); 및 80 내지 240 nm의 간격 (Spacing)의 나노패턴 배양접시에서 배양하여 심근세포로 분화시키는 단계를 포함하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 상기 나노패턴의 직경은 200 내지 280 nm인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 나노패턴의 간격은 160 내지 240 nm인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 나노패턴은 직경이 일정하게 증가하고, 간격이 일정하게 감소하는 이중구배인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 중배엽 세포를 200 내지 500 nm의 높이 (Height)를 갖고, 직경 (Diameter)은 200 내지 280 nm로 일정하게 증가하고 간격 (Spacing)은 240 내지 160 nm로 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴 배양접시에서 배양하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 중배엽 세포는 1×10^4 내지 2×10^4 세포/cm²로 접종하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 배양은 4일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 배양은 FBS, L-글루타민 (L-Glutamine), 페니실린 (Penicillin), 스트렙토마이신 (Streptomycin), 베타-머캅토에탄올 (β -Mercaptoethanol) 및 심근세포 분화유도인자 복합물이 포함된 α -MEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 심근세포 분화유도인자는 사이클로스포린 에이 (Cyclosporin A)를 포함하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 10] 줄기세포에서 유도된 배상체를 200 내지 500 nm의 높이 (Height); 120 내지 360 nm의 직경 (Diameter); 및 80 내지 240 nm의 간격 (Spacing)의 나노패턴 배양접시에서 배양하여 심근세포로 분화시키는 단계를 포함하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 나노패턴의 직경은 280 내지 360 nm인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 나노패턴의 간격은 80 내지 160 nm인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 나노패턴은 직경이 일정하게 증가하고, 간격이

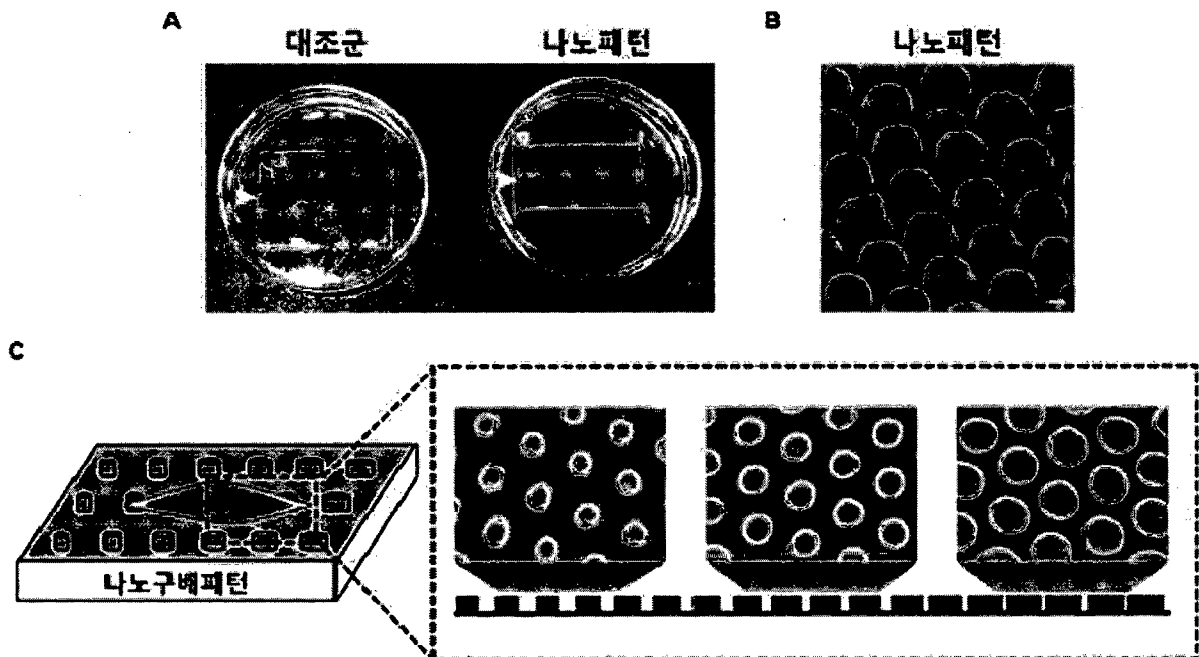
일정하게 감소하는 이중구배인 것을 특징으로 하는 줄기세포를
심근세포로 분화시키는 방법.

- [청구항 14] 제10항에 있어서, 배상체를 200 내지 500 nm의 높이 (Height)를 갖고, 직경 (Diameter)은 280 내지 360 nm로 일정하게 증가하고 간격 (Spacing)은 160 내지 80 nm로 일정하게 감소하는 이중구배 나노패턴 배양접시에서 배양하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 15] 제10항에 있어서, 나노패턴 배양접시에 배상체 10개를 부착시켜 배양하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 16] 제10항에 있어서, 상기 배양은 8일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 17] 제1항 또는 제10항에 있어서, 상기 나노패턴은 돌기형인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.
- [청구항 18] 제1항 또는 제10항에 있어서, 상기 줄기세포는 만능 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 방법.

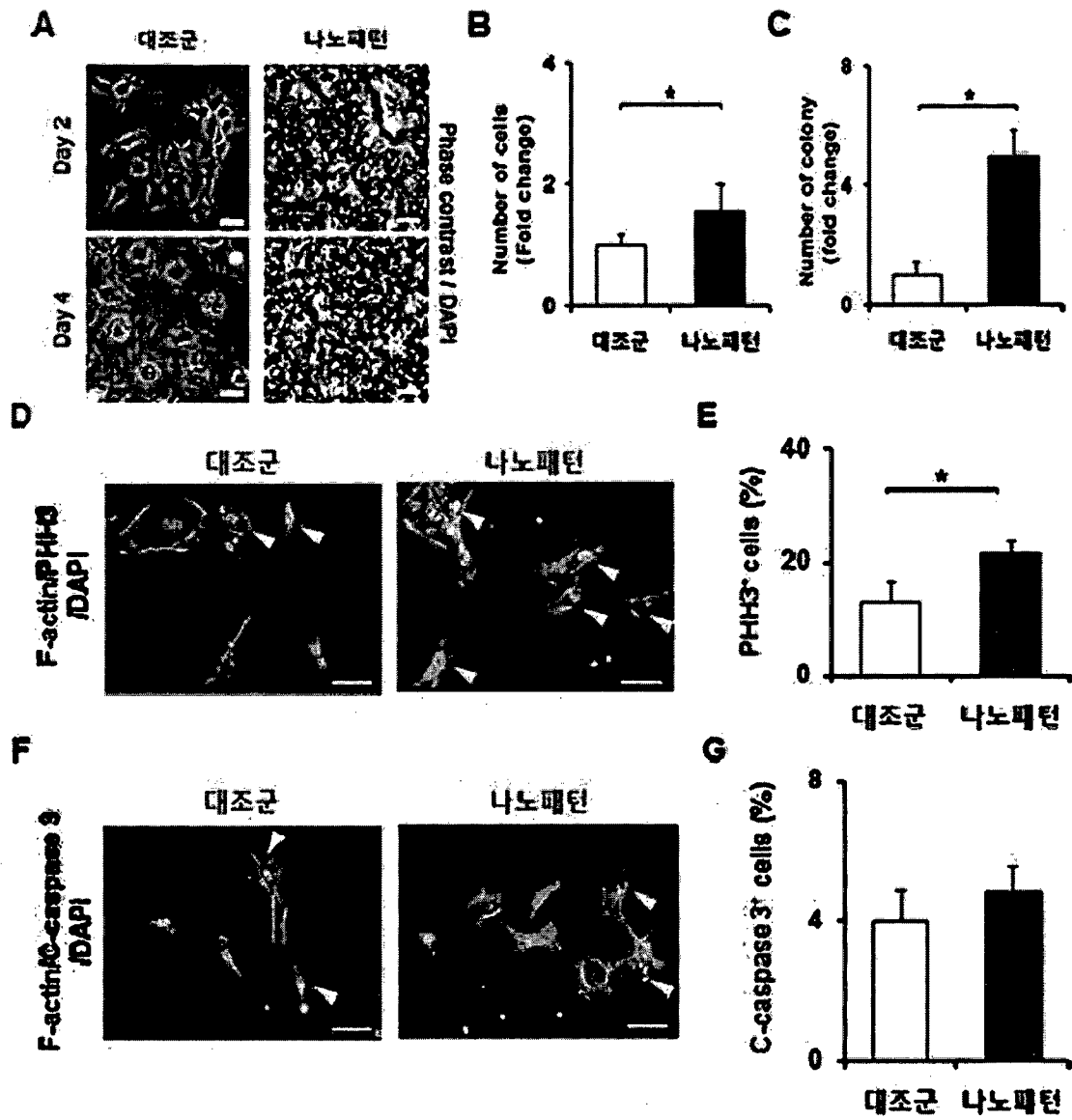
[도1]



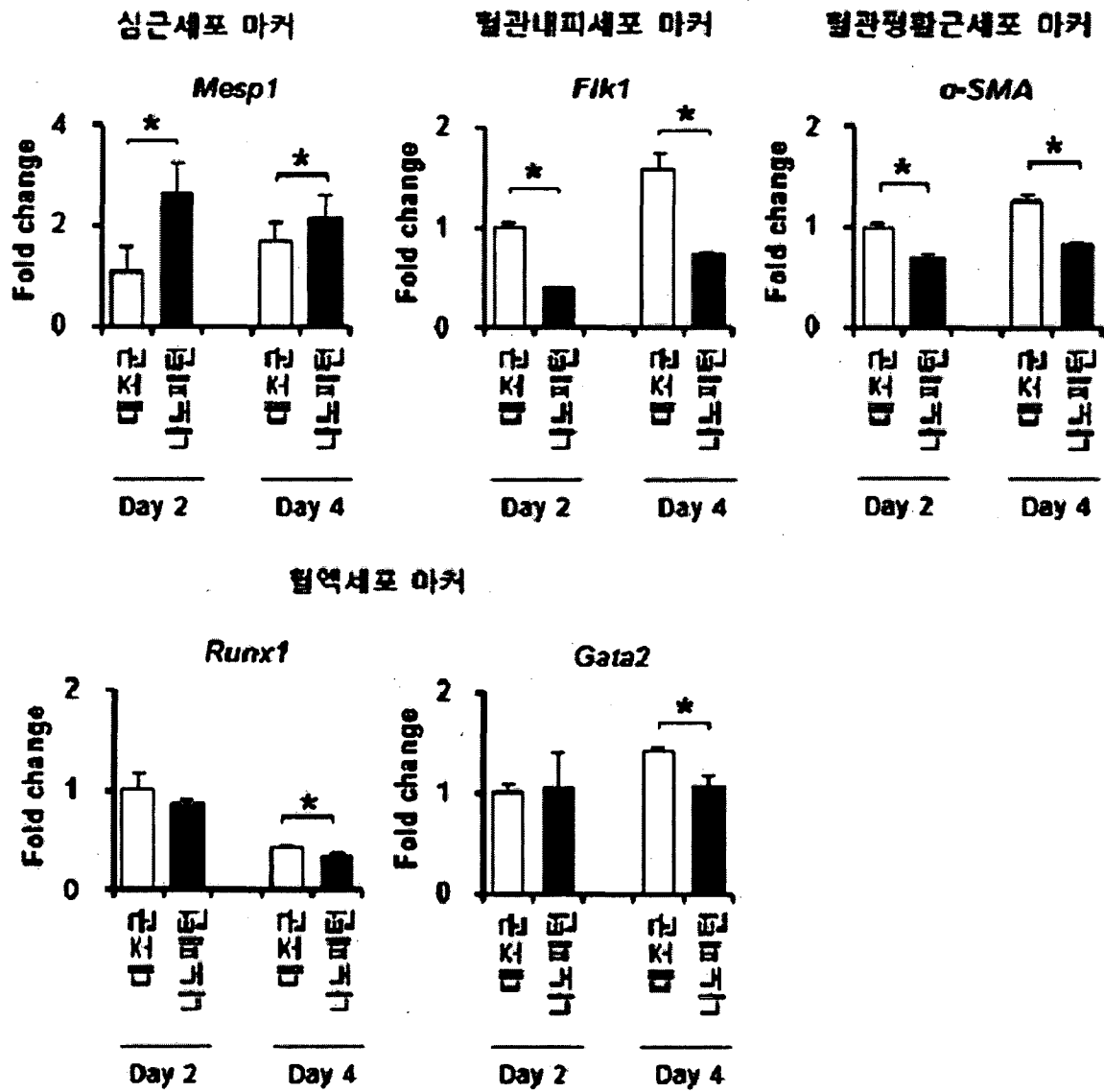
[도2]



[도3]

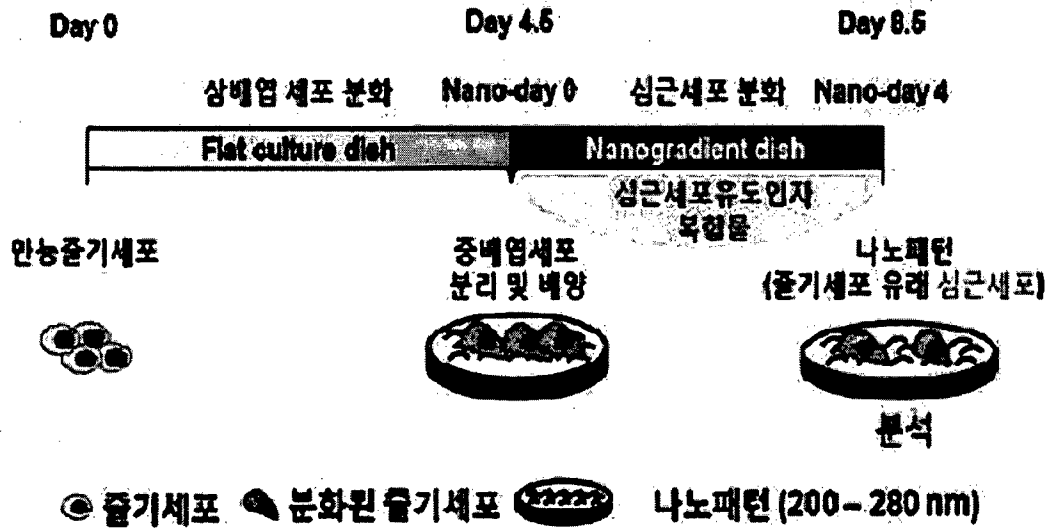


[도4]

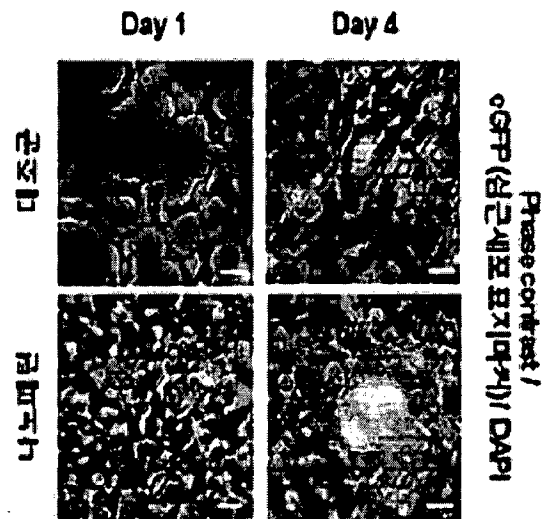


[도5]

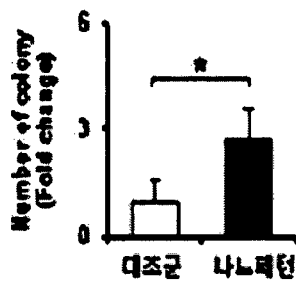
A



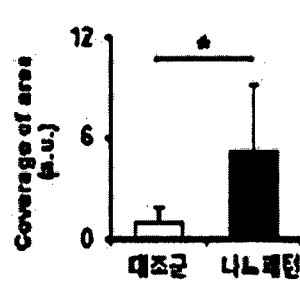
B



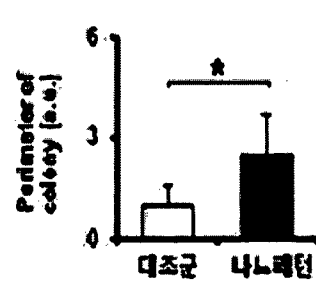
C



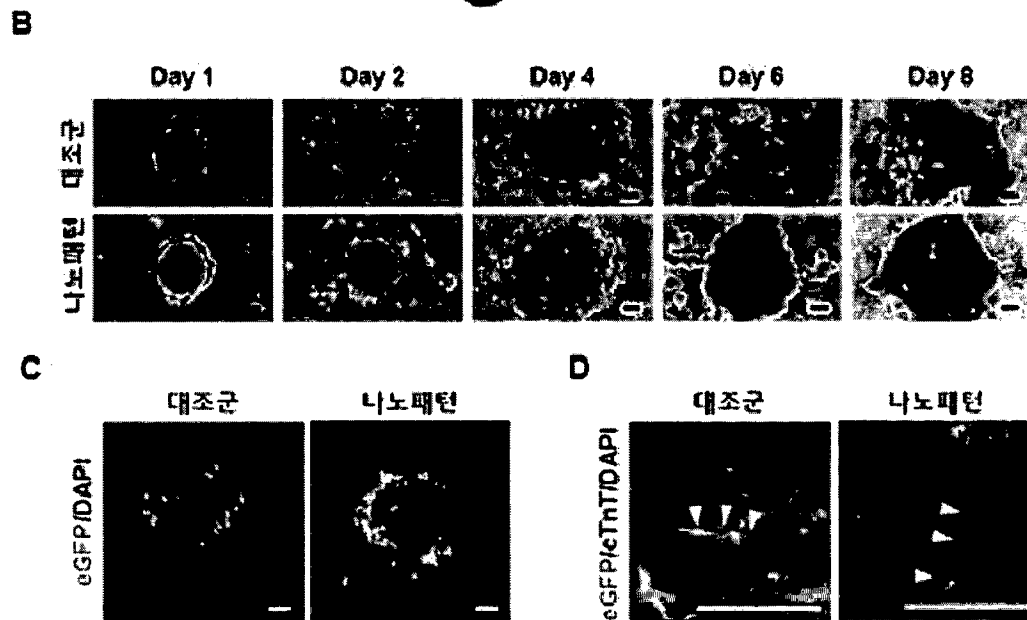
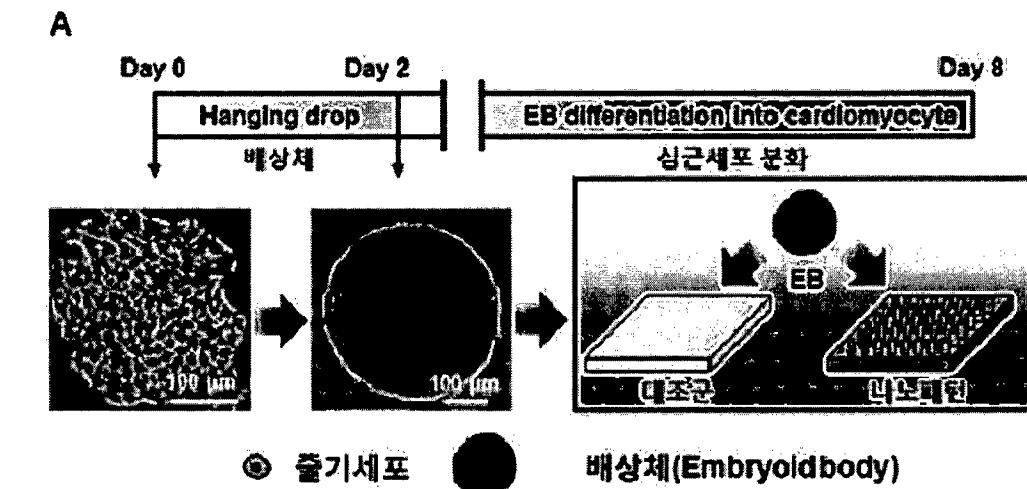
D



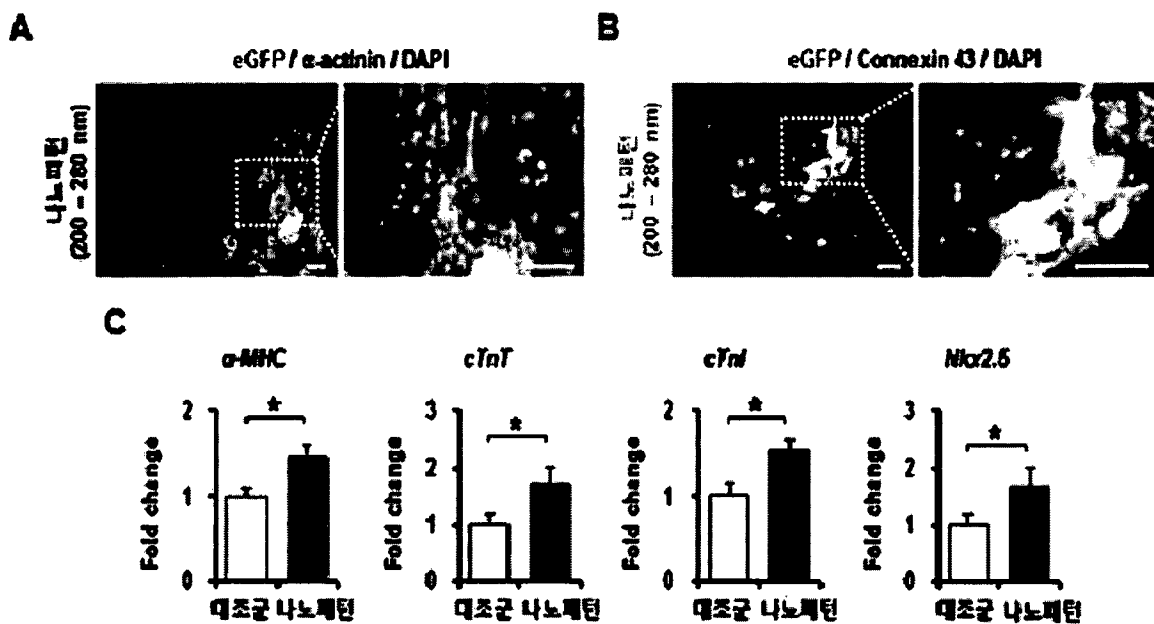
E



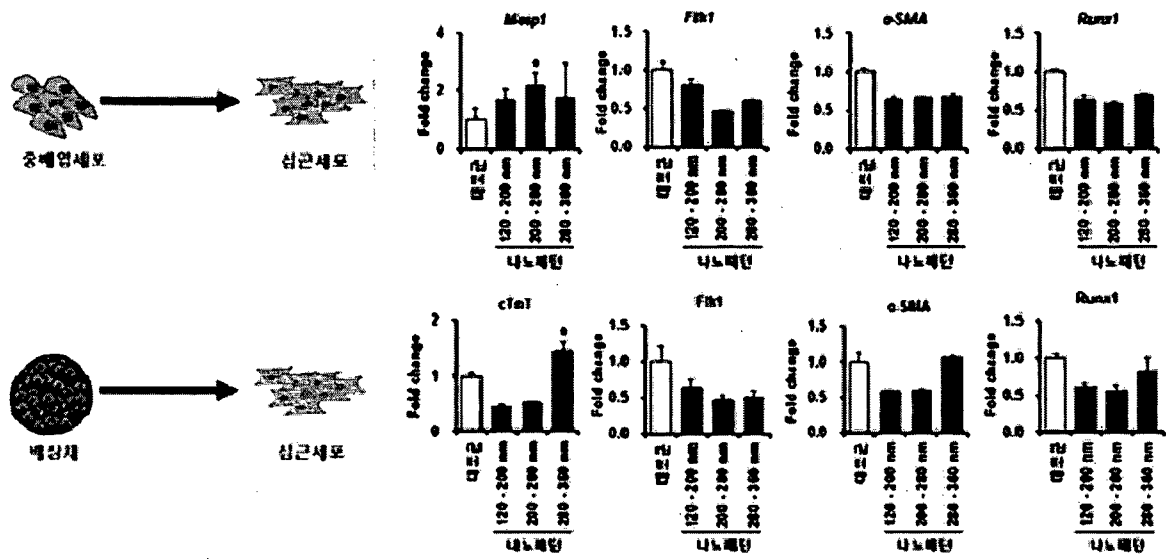
[도6]



[도7]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007285**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/077(2010.01)i, C12N 5/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/077; C12M 1/00; C12Q 1/02; A61P 9/00; C12M 1/18; C12N 5/0735; C12N 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mesoderm cell, nano pattern, cardiocytic, embryoid body, differentiation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0129841 A (CHABIO&DIOSTECH CO., LTD. et al.) 07 November 2014 See paragraphs [0014] and [0024].	1-18
A	KR 10-2012-0117342 A (SEOULIN BIO SCIENCE CO., LTD.) 24 October 2012 See claims 1 and 4-6.	1-18
A	KR 10-2010-0039944 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 19 April 2010 See claims 1-2.	1-18
A	HONG, Yoon Mi et al., "Physical and Chemical Effects of Extracellular Matrix on the Growth of Cardiomyocytes (HL-1)", Transactions of the Korean Society of Mechanical Engineers - B, 28 April 2011, vol. 35, no. 11, pages 1229-1235 See 4. conclusion section, abstract.	1-18
A	JP 2016-127849 A (INSTITUTE OF BIOPHYSICS CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 14 July 2016 See claim 1.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 DECEMBER 2017 (08.12.2017)

Date of mailing of the international search report

11 DECEMBER 2017 (11.12.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0129841 A	07/11/2014	KR 10-1490671 B1 WO 2014-178670 A1	06/02/2015 06/11/2014
KR 10-2012-0117342 A	24/10/2012	KR 10-1264243 B1	22/05/2013
KR 10-2010-0039944 A	19/04/2010	WO 2010-041874 A2 WO 2010-041874 A3	15/04/2010 29/07/2010
JP 2016-127849 A	14/07/2016	AU 2010-355614 A1 AU 2010-355614 B2 AU 2015-230768 A1 CA 2802526 A1 CN 103228782 A CN 103228782 B CN 104762255 A CN 104774804 A EP 2580317 A1 JP 2013-531497 A US 2013-0209416 A1 US 2016-0122719 A1 US 9273286 B2 WO 2011-157029 A1	10/01/2013 02/07/2015 15/10/2015 22/12/2011 31/07/2013 30/03/2016 08/07/2015 15/07/2015 17/04/2013 08/08/2013 15/08/2013 05/05/2016 01/03/2016 22/12/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/077(2010.01)i, C12N 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/077; C12M 1/00; C12Q 1/02; A61P 9/00; C12M 1/18; C12N 5/0735; C12N 5/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중배엽 세포, 나노패턴, 심근세포, 배상체, 분화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2014-0129841 A ((주)차바이오텍 등) 2014.11.07 단락 [0014] 및 [0024] 참조.	1-18
A	KR 10-2012-0117342 A (주식회사 서린바이오사이언스) 2012.10.24 청구항 1 및 4-6 참조.	1-18
A	KR 10-2010-0039944 A (서울대학교산학협력단) 2010.04.19 청구항 1-2 참조.	1-18
A	홍윤미 등, '세포외 기질 물질의 물리·화학적 영향에 따른 심근세포(HL-1)의 성장 연구', 대한기계학회논문집 B권, 2011.04.28, 35권, 11호, 페이지 1229-1235 "4. 결론" 섹션, 초록 참조.	1-18
A	JP 2016-127849 A (INSTITUTE OF BIOPHYSICS CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 2016.07.14 청구항 1 참조.	1-18

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 12월 08일 (08.12.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 12월 11일 (11.12.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



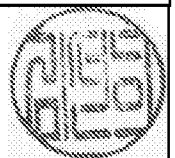
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0129841 A	2014/11/07	KR 10-1490671 B1 WO 2014-178670 A1	2015/02/06 2014/11/06
KR 10-2012-0117342 A	2012/10/24	KR 10-1264243 B1	2013/05/22
KR 10-2010-0039944 A	2010/04/19	WO 2010-041874 A2 WO 2010-041874 A3	2010/04/15 2010/07/29
JP 2016-127849 A	2016/07/14	AU 2010-355614 A1 AU 2010-355614 B2 AU 2015-230768 A1 CA 2802526 A1 CN 103228782 A CN 103228782 B CN 104762255 A CN 104774804 A EP 2580317 A1 JP 2013-531497 A US 2013-0209416 A1 US 2016-0122719 A1 US 9273286 B2 WO 2011-157029 A1	2013/01/10 2015/07/02 2015/10/15 2011/12/22 2013/07/31 2016/03/30 2015/07/08 2015/07/15 2013/04/17 2013/08/08 2013/08/15 2016/05/05 2016/03/01 2011/12/22