



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0057741
(43) 공개일자 2013년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) *C12M 3/00* (2006.01)

C12N 5/0786 (2010.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0123635

(22) 출원일자 2011년11월24일

심사청구일자 2011년11월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

정은경

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 503호 (서천동, 경희대학교)

손영숙

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 503호 (서천동, 경희대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

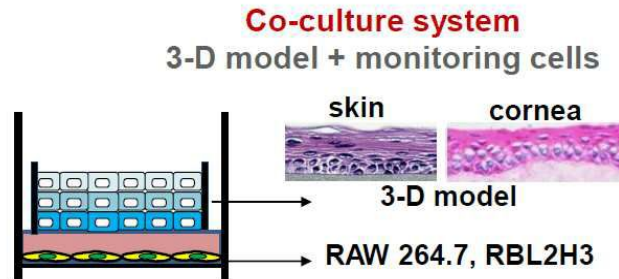
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 동물실험 대체를 위한 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 동물실험을 대체할 수 있는 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템을 제공한다. 본 발명의 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템은 생체 조직과 기능적 유사성을 나타내며, 따라서, 화장품 내지 의약품 등의 염증 및 알레르기 시험, 내지 염증 및 알레르기 치료용 약물의 개발을 위한 시험에 있어서 동물실험을 대체할 수 있는 최적의 시험 모델이 된다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

임지은

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 503호 (서천동, 경희대학교)

최형원

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 503호 (서천동, 경희대학교)

김선아

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 503호 (서천동, 경희대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A103017

부처명 보건복지부

연구사업명 글로벌코스메틱연구개발사업

연구과제명 동물실험 대체 염증 및 알레르기 평가시스템 개발

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.02.01 ~ 2011.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기를 포함하는 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템의 제조방법:

(1) 하기를 포함하는 3차원 인공 조직을 함유하는 트랜스웰 상부 챔버의 제조 단계:

(i) I형 콜라겐 혼합물에 섬유아세포를 현탁하는 단계,

(ii) 상기 현탁물을 트랜스웰 상부 챔버에 첨가하여 고형화 한 후, 배양 배지를 넣어 배양하여 다층 세포 증식물을 형성하는 단계,

(iii) 상기 배양하여 얻어진 다층 세포 증식물의 상부 표면을 IV형 콜라겐 및 라미닌 혼합액으로 코팅하는 단계, 및

(iv) 상기 코팅된 다층 세포 증식물 표면에 상피세포를 접종한 후 배양하는 단계;

(2) 하기를 포함하는 모니터링 세포를 함유하는 트랜스웰 하부 챔버의 제조 단계:

(v) 모니터링 세포를 배양 배지에서 배양하는 단계, 및

(vi) 상기 배양된 모니터링 세포를 트랜스웰 배양 배지를 함유하는 하부 챔버에 접종하고 배양하는 단계;

(3) 상기 단계 (1)에서 제조된 3차원 인공 조직을 함유하는 트랜스웰 상부 챔버를 상기 단계 (2)에서 제조된 모니터링 세포를 함유하는 트랜스웰 하부 챔버 내의 상단부에 위치시키고, 배양 배지를 상부 챔버 하단부 내지 3차원 인공 조직 상단부까지 채워 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템을 제조하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 섬유아세포는 피부 섬유아세포 또는 각막 섬유아세포인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 피부 섬유아세포는 사람 유래 섬유아세포이며, 각막 섬유아세포는 토끼 각막 유래 각막 섬유아세포인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상피세포는 각질세포 또는 각막유래상피세포인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 모니터링 세포는 대식세포인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 대식세포는 생쥐 대식세포주인 RAW264.7 세포주인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단계 (3) 이후, LPS (lipopolysaccharide) 처리에 의하여 대식세포가 진피 대식세포로 전환된 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 모니터링 세포는 비만세포인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 비만세포는 쥐 비만세포주인 RBL-2H3 세포주인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상부 챔버의 바닥면은 미세다공성 막으로 구성된 방법.

청구항 11

제1항 내지 10항 중 어느 한 방법으로 제조된 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서, 염증 반응 또는 알레르기 반응 평가를 위한 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템.

청구항 13

제11항의 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템의 3차원 인공 조직 표면에 시험물질을 적용하는 단계를 포함하는 시험물질의 염증 반응 또는 알레르기 반응을 평가하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 시험물질의 각막 또는 피부에 대한 염증 반응 또는 알레르기 반응을 평가하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 하기의 하나 이상의 지표의 증가를 통하여 시험물질의 염증 반응을 평가하는 방법:

- (a) 세포배양액 내 모니터링 세포 내 액포의 형성 수준,
- (b) 세포배양액 내 분비된 IL-6, IL-10, 또는 이들 모두의 생성 수준, 또는
- (c) 세포배양액 내 분비된 iNOS, Cox-2, 또는 이들 모두의 생성 수준.

청구항 16

제13항에 있어서, 세포배양액 내 β -헥소사미니다제의 활성 수준의 증가를 통하여 시험물질의 알레르기 반응을 평가하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 시험물질은 염증 또는 알레르기의 치료 후보물질인 방법.

명 세 서

기술분야

[0001] 본 발명은 화장품 내지 의약품 등의 동물실험 대체를 위한 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템에 관한 것이다.

배경기술

[0002] EU를 필두로 미국, 일본에서 동물 복지와 관련하여 동물실험의 대체시험법에 관련된 법규의 제정과 동물사용의 규제가 확산되고 있으며 현재 국립독성과학원에서는 화장품 등의 안정성 평가 시 국제적으로 대두되고 있는 동물대체시험법에 대한 가이드라인을 제정하였다.

[0003] 2007년 광독성시험 대체시험법으로 <In vitro 3T3 NRU 광독성 시험>과 피부 감각성시험에 대한 동물 대체시험법으로 <국소림프절 시험법, Local lymph assay>에 대한 가이드라인에 이어 2009년 피부 부식시험에 대한 대체시험법인 <경피성 전기저항 시험, Transcutaneous Electrical Resistance Test, TER>, <인체 유래 인공피부 모델 시험, Human skin model test>, <In vitro 방어막 시험, In vitro membrane barrier test>가 제정되었으며, 계속적인 동물대체 시험법에 대한 연구와 가이드라인 제정이 요구되고 있다.

[0004] 현재 피부 독성 평가 방법에 대한 대체법은 자극의 정도만을 평가하는 시스템으로 피부, 안점막 및 호흡계의 염증과 알레르기 유발 정도를 평가하는 기술에 대한 연구는 전무한 실정으로 단편적 in vitro 시스템을 생체와 유

사한 조건에서 평가하기 위한 시스템으로 개선하여 인공 피부 또는 각막 대체물과의 동시 배양시스템에서 대식 세포, 비만세포의 염증 및 알레르기 반응성 평가를 통한 새로운 동물 대체시험법을 확립할 수 있다.

[0005] 현재까지 염증 및 알레르기 평가 기술은 크게 동물을 사용한 평가기술과 세포를 사용한 평가 기술이 이용되고 있다.

[0006] 현재 피부 알레르기 평가를 위하여 아토피성 피부염 동물 모델을 사용하는 것이 가장 보편적이며, NC/Nga 마우스를 이용한 아토피 피부염 유발 모델이 가장 많이 사용되고 있으며, 이를 이용한 spontaneously developed dermatitis 모델은 면역병리학적 이상이 사람에게서 발생하는 병변과 매우 유사하다고 알려져 있으나, 자연 유발률이 50% 이하이며, 발병 정도와 시기가 다양한 어려움이 있으며, 또한 비용면에서도 마리당 10 만원선의 고비용이 소요되며, 아토피성 피부염의 발현 효율을 높이기 위하여 Hapten과 mite antigen (DP, dermatophagoides pteronyssinus allergen; DF, Dermatophagoides farinae allergen) 투여 부분을 3M tape등을 이용하여 3번씩 스트리핑하거나 고의로 사육 환경을 청결하게 유지하지 않는 가학적인 방법이 널리 사용되고 있다. 또한, NC/Nga 아토피 피부염 유발 후 생화학적 분석 및 행동 분석이 행하여지며, 아토피성 피부염의 평가는 현재 피부 육안 병변 관찰과 조직 병리학적 검사로 수행되고 있다. 시험물질 투여로 인한 피부의 농양성 염증, 출혈, 습진, 홍반, 가피 탈피 등의 피부염 관련 병변 관찰과 병변 피부 조직의 면역병리학적 이상을 H&E 염색과 Toluidine blue 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하는 방법을 사용하고 있다. 행동 분석을 위하여 부검 전 캄코더를 이용하여 1시간 동안 굶는 횟수를 측정하는 방법이 채택되고 있다.

[0007] 한편, 세포를 사용한 평가 기술은 비만 세포주를 이용한 평가법이 이용되며, 아토피 피부염에서 나타나는 두 가지 면역학적 이상은 IgE의 증가와 T림프구의 기능적 이상인데 IgE의 증가는 비만 세포의 탈과립화를 유도하여 과민성 면역반응을 평가하게 된다. 따라서 비만 세포주인 RBL-2H3 세포주를 이용하여 IgE-매개성 hexosaminidase assay를 수행함으로써 알레르기 반응성 정도를 평가한다. 골수유래 비만세포 (BMNC)역시 사용되고 있는데 세포의 확보를 위해 쥐의 대퇴골과 경골 절개 후 골 안쪽을 추출하는 방법을 통해 특수 배양 배지에서 배양하여야 한다. 또한, 비장세포를 이용한 평가법 역시 이용되며, 알레르기 반응에 원인이 되는 IgE는 Th2 cytokine 의해 분비되므로 세포 면역기능의 평가가 중요 평가 지표로 사용된다. 이를 위해 무균상태에서 비장을 채취한 후, 비장 세포를 48시간동안 배양기에서 배양하여 배양액 내에 분비된 IL-4, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, TNF- α 등의 사이토카인을 ELISA로 평가한다.

[0008] 현재까지 알레르기 평가는 아토피 피부염 모델에 한정되어 있으며, 실험 동물군을 가학적 실험방법으로 유도한 동물모델에서 평가한다는 문제가 있으며, 또한, 고비용이 소요된다. 한편, in vitro 세포 모델에서는 단편적으로 비만 세포주와 골수유래 비만 세포주를 골수에서 직접 추출하여 사용하는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 특2001-0070541호 (2001.7.25. 공개)
- (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2007-0018220호 (2007.2.14. 공개)
- (특허문헌 0003) 대한민국 공개특허공보 제10-2007-0098973호 (2007.10.8. 공개)
- (특허문헌 0004) 대한민국 공개특허공보 제10-2009-0094664호 (2009.9.8. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 화장품 내지 의약품 등의 염증 및 알레르기 테스트에 있어서, 동물실험을 대체할 수 있는 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 화장품 내지 의약품 등의 염증 및 알레르기 테스트, 내지 염증 및 알레르기 치료용 약물의 개발을 위한 실험에 있어서, 동물실험을 대체할 수 있는 모델에 관하여 예의 연구한 결과, 동물실험 대체를 위한 3

차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 하기를 포함하는 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템의 제조방법을 제공한다:

[0013] (1) 하기를 포함하는 3차원 인공 조직을 함유하는 트랜스웰 상부 챔버의 제조 단계:

[0014] (i) I형 콜라겐 혼합물에 섬유아세포를 현탁하는 단계:

[0015] (ii) 상기 현탁물을 트랜스웰 상부 챔버에 첨가하여 고형화 한 후, 배양 배지를 넣어 배양하여 다층 세포 증식물을 형성하는 단계;

[0016] (iii) 상기 배양하여 얻어진 다층 세포 증식물의 상부 표면을 IV형 콜라겐 및 라미닌의 혼합액으로 코팅하는 단계; 및

[0017] (iv) 상기 코팅된 다층 세포 증식물 표면에 상피세포를 접종한 후 배양하는 단계,

[0018] (2) 하기를 포함하는 모니터링 세포를 함유하는 트랜스웰 하부 챔버의 제조 단계:

[0019] (v) 모니터링 세포를 배양 배지에서 배양하는 단계; 및

[0020] (vi) 상기 배양된 모니터링 세포를 트랜스웰 배양 배지를 함유하는 하부 챔버에 접종하고 배양하는 단계, 및

[0021] (3) 상기 단계 (1)에서 제조된 3차원 인공 조직을 함유하는 트랜스웰 상부 챔버를 상기 단계 (2)에서 제조된 모니터링 세포를 함유하는 트랜스웰 하부 챔버 내의 상단부에 위치시키고, 배양 배지를 상부 챔버 하단부 내지 3차원 인공 조직 상단부까지 채워 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템을 제조하는 단계.

[0022] 상기 제조방법에서, 섬유아세포는 피부 섬유아세포 또는 각막 섬유아세포이며, 바람직하게는, 피부 섬유아세포는 사람 유래 섬유아세포이며, 각막 섬유아세포는 토끼 각막 유래 각막 섬유아세포이다.

[0023] 상기 제조방법에서, 단계 (iv)의 상피세포는 각질세포 또는 각막유래상피세포이다.

[0024] 상기 제조방법에서, 모니터링 세포는 대식세포 또는 비만세포이며, 바람직하게는, 대식세포는 생쥐 대식세포주인 RAW264.7 세포주 (KCLB No. 40071) 이고, 비만세포는 쥐 비만세포주인 RBL-2H3 세포주 (ACTT, CRL-2256™) 이다. 특히, 염증 반응을 평가하기 위한 모델에서 모니터링 세포는 대식세포가 사용되며, 알레르기 반응을 평가하기 위한 모델에서 모니터링 세포는 비만세포가 사용된다.

[0025] 상기 제조방법에서, 염증 반응을 평가하기 위한 공동배양시스템을 제조하기 위한 또다른 구현예로써, 상기 단계 (3) 이후, LPS (lipopolysaccharide)를 처리하여 대식세포가 진피 대식세포로 전환되는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 트랜스웰 플레이트는 당 분야에서 널리 사용되는 것으로, 상업적으로 시판되는 제품을 사용할 수 있으며, 대표적으로는 Corning Incorporated 사로부터 시판되는 제품을 사용할 수 있다. 제품에 대한 상세한 정보는 Corning Incorporated 사에서 제공하는 제품 카탈로그 내지 웹사이트 (www.corning.com)로부터 얻을 수 있으며, 실제로, 트랜스웰 플레이트에 대한 정보 및 사용법은 당 분야의 통상의 기술적 지식을 가진 자의 기술 수준의 범위 내에 있다.

[0027] 도 10 에 예시적으로 나타난 바와 같이, 트랜스웰 플레이트는 하단부가 미세다공성 막으로 이루어진 상부 챔버 (Upper Chamber; 제품 카탈로그 내지 당 분야에서는 트랜스웰 인서트라고도 지칭됨)와 배지를 함유하는 하부 챔버 (Lower Chamber)로 구성되며, 상부 챔버는 하부 챔버의 내부에 위치하며, 두 챔버는 배양배지를 공유한다. 여기서, 미세다공성 막은 세포분리물질과 같은 세포성 물질, 배양배지는 투과하나, 세포는 투과할 수 없는 지지체로써, 미세다공성 막의 구멍의 크기는 당업자가 적절히 채택할 수 있으며, 예컨대, 0.4 μm 내지 0.8 μm 이다.

[0028] 트랜스웰 상부 챔버의 바닥면을 구성하는 미세다공성 막은 그 위의 세포 배양 및 성장을 지지할 수 있는 투과성 지지체로써, 당 분야에서 통상적으로 사용되는 재료로 이루어진 막을 이용할 수 있으며, 예컨대, 폴리카르보네이트, 폴리에스테르, 콜라겐-코팅된 폴리테트라플루오로에틸렌 등이 미세다공성 막으로 이용될 수 있다.

[0029] 상기 단계 (i)의 I형 콜라겐 혼합물은 세포 배양을 위한 적절한 배지와 I형 콜라겐의 혼합물로써, 일례로써, I형 콜라겐 (Nitta gelatin), 10배 농도의 DMEM(Gibco) 및 재구성 완충액(2.2 g NaHCO_3 와 4.77 g HEPES 을 0.05 N NaOH 용액 100 ml에 녹인 완충액)을 8:1:1의 비율로 혼합하여 제조될 수 있다.

[0030] 상기 제조방법에서 사용되는 배양 배지는 세포 배양을 위하여 당 분야에서 통상적으로 사용되는 배지이며, 배지

의 조성은 세포의 종류 및 특성에 따라 당업자가 변형할 수 있으며, 이는 당업자의 기술 수준의 범위 내에 있다. 예컨대, DMEN과 F12의 혼합배지, 10% FBS를 함유하는 DMEN 배지 등이 본 발명의 구현을 위하여 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명은 또한 상기한 제조방법에 의하여 제조된 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양시스템을 제공한다.

[0032] 본 발명의 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양시스템은 도 3에 예시적으로 도시화된 바와 같이 일종의 장치이나, 단순 기계 장치라고 할 수 없으며, 따라서, 보다 적절한 표현을 위하여 본원에서는 '시스템'으로 지칭한다. 그러나, 본 발명의 본질을 해치지 않는다면 이는 장치로 해석될 수 있다.

[0033] 본 발명의 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템은 3차원 인공 조직을 함유하는 트랜스웰 상부 챔버, 모니터링 세포를 함유하는 트랜스웰 하부 챔버 및 배양 배지를 함유하며, 여기서 트랜스웰 상부 챔버는 트랜스웰 하부 챔버 내에 위치하여, 배양배지는 상부 챔버 하단부 내지 3차원 인공 조직 상단부까지 채워지며, 바람직하게는 상부 챔버 하단부까지 채워진다.

[0034] 트랜스웰 상부 챔버 내 3차원 인공 조직은 상기 단계 (i) 내지 (iv)를 포함하는 방법에 의하여 형성되며, 3차원 인공 피부 조직 또는 3차원 인공 각막 조직이다.

[0035] 트랜스웰 하부 챔버 내 모니터링 세포는 대식세포 또는 비만세포이며, 염증 반응 모델을 위한 공동배양 시스템의 경우 대식세포가 바람직하며, 알레르기 반응 모델을 위한 공동배양 시스템의 경우 비만세포가 바람직하다.

[0036] 현재까지, 피부 모델은 표피층과 진피층만을 포함한 구조적 유사성만 확보되어 있는 모델로 1차적 방어 기작을 수행할 수 있는 기능적 피부모델은 전무하였던바, 본 발명의 3차원 인공 피부 조직을 포함하는 공동배양시스템은 진피 대식세포를 함유한 기능적 피부모델로써 생체기능과 가장 유사한 평가시스템으로 활용할 수 있다.

[0037] 따라서, 본 발명의 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템은 화장품 내지 의약품 등의 염증 및 알레르기 테스트, 내지 염증 및 알레르기 치료용 약물의 개발을 위한 실험에 있어서, 동물실험을 대체할 수 있다.

[0038] 본 발명은 또한 상기한 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템을 이용한 시험물질의 염증 반응 또는 알레르기 반응의 평가방법을 제공한다.

[0039] 본 발명의 시험물질의 염증 반응 또는 알레르기 반응의 평가방법은 상기한 3차원 인공 조직 표면에 시험물질을 적용하는 단계를 포함한다. 도 11은 염증 또는 알레르기 반응을 테스트하기 위하여 본 발명의 공동배양시스템에 시험물질을 적용하는 모습을 예시적으로 나타내고 있다.

[0040] 본 발명에서 시험물질은 눈 또는 피부에 대한 염증 반응 또는 알레르기 반응을 평가하기 위한 임의의 후보물질로써, 눈 또는 피부에 직접 또는 간접적으로 적용하기 위한 화장품 또는 의약품의 후보가 되는 화합물, 천연물, 추출물, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 또한, 시험물질은 염증 반응 내지 알레르기 반응의 치료를 위한 후보물질일 수 있다.

[0041] 따라서, 본 발명의 시험물질의 염증 반응 또는 알레르기 반응의 평가방법은 시험물질의 각막 또는 피부에 대한 염증 반응 또는 알레르기 반응을 평가하는 방법을 포함한다.

[0042] 본 발명의 시험물질의 평가방법은 (a) 세포배양액 내 모니터링 세포 내 액포의 형성 수준, (b) 세포배양액 내 분비된 IL-6, IL-10, 또는 이들 모두의 생성 수준, 또는 (c) 세포배양액 내 분비된 iNOS, Cox-2, 또는 이들 모두의 생성 수준으로부터 선택되는 하나 이상의 지표의 증가를 통하여 시험물질의 염증 반응을 평가할 수 있다.

[0043] 본 발명의 시험물질의 평가방법은 세포배양액 내 β -헥소사미니다제의 활성 수준의 증가를 통하여 시험물질의 알레르기 반응을 평가할 수 있다.

[0044] 현재, 염증 및 알레르기 질환의 빈도가 증가하는 만큼 그 치료제와 예방 후보물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 정확한 평가를 위한 신뢰성 높은 평가 모델 개발이 선행되어야 하며, 특히 개체간 변이가 있는 실험동물 모델을 모든 후보 물질에 적용하기 위하여 고비용이 요구되는 실정이다. 따라서 본 발명의 차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템에 의하면, 기존 화장품 성분의 염증과 알레르기 평가를 위해 진행되는 동물실험을 대체하여 염증과 알레르기 반응의 재현성 높은 대규모 스크리닝이 가능해 질 수 있다. 또한, 이를 통해 염증 및 알레르기 질환의 치료제와 예방물질 탐색의 표준화된 지표도 마련할 수 있다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 3차원 인공 조직 및 모니터링 세포의 공동배양 시스템은 생체 조직과 기능적 유사성을 나타내며, 따라서, 화장품 내지 의약품 등의 염증 및 알레르기 시험, 내지 염증 및 알레르기 치료용 약물의 개발을 위한 시험에 있어서 동물실험을 대체할 수 있는 최적의 시험 모델이 된다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 3차원 인공 피부 조직, 각막 조직과 생체조직을 H&E염색한 후 비교한 사진이다((A) 정상 토끼 각막 조직, (B) 3차원적으로 구성된 토끼의 인공 각막 조직, (C) 정상 사람 피부조직, (D) 3차원적으로 구성된 사람의 인공 피부 조직).

도 2는 3차원 인공 피부 조직, 각막 조직의 면역 조직 화학 염색 결과를 나타낸 사진이다 (3차원 인공 피부조직: A~C, 3차원 인공 각막 조직: D~F; (A) 케라틴 5, (B) 케라틴 10, (C) 케라틴 3+12, (D) 케라틴 5, (E) 케라틴 10, (F) 케라틴 3/12 면역염색 사진).

도 3은 3차원 인공 조직과 모니터링 세포의 공동배양시스템의 구조를 예시적으로 나타낸 도면이다.

도 4는 염증 모델에서 RAW264.7 세포주의 형태 변화를 나타낸 사진이다 (+3D skin: 3차원 인공 피부 조직과 모니터링 세포의 공동배양시스템; +3D cornea: 3차원 인공 각막 조직과 모니터링 세포의 공동배양시스템).

도 5는 염증 모델에서 RAW264.7 세포주의 사이토카인 (IL-6, IL-10, TNF- α 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 염증 모델에서 RAW264.7 세포주의 염증반응 (iNOS, Cox-2 수준)을 확인한 결과를 나타낸 겔 사진이다.

도 7은 염증 모델에서 RAW264.7세포주의 진피대식세포층으로의 특성을 확인한 겔 사진이다.

도 8은 본 발명의 공동배양시스템이 생체 피부와 기능적 유사성을 보여주는 도이다.

도 9는 알레르기 모델에서 DNP-IgE와 DNP-BSA에 의해 유도되는 알레르기 반응성을 확인한 결과이다.

도 10은 트랜스웰 플레이트의 구조를 나타낸 도이다.

도 11은 염증 또는 알레르기 반응을 테스트하기 위하여 본 발명의 공동배양시스템에 시험물질을 적용하는 모습을 예시적으로 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 제조예, 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 제조예, 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0048] [제조예]

[0049] <제조예 1> 3차원 인공 피부 조직 함유 트랜스웰 상부 챔버(인서트)의 제조

[0050] 1형 콜라겐을 피부 섬유아세포와 혼합하여 만든 진피층 위에 표피세포를 접종하여 배양하는 3차원적 배양법을 사용하였다. 표피세포는 공기층과 물층의 중간에서 배양됨으로써 중층편평상피로 분화하며 각질화되어 실질적인 피부 구조를 형성할 수 있도록 하였다.

[0051] 진피 대응물로서 콜라겐 혼합물은 I형 콜라겐 (Nitta gelatin), 10배 농도의 DMEM(Gibco) 및 재구성 완충액 (2.2 g NaHCO₃와 4.77 g HEPES 을 0.05 N NaOH 용액 100 ml에 녹인 완충액)을 8:1:1의 비율로 혼합하여 준비하였다. 콜라겐의 겔화를 막기 위하여 진피 대응물의 제조는 4℃에서 실시하였다. 직경 12mm의 트랜스웰 인서트 (Transwell; Corning, NY.)를 준비하였다. 피부 섬유아세포(사람 피부 조직으로부터 초대배양)를 배양접시로부터 회수하여 1×10^6 세포/ml의 농도로 기포가 생기지 않게 주의하여 콜라겐 혼합물에 현탁하였다. 200 μ l의 콜라겐 혼합물을 트랜스웰 인서트 내부에 넣어주고, 37℃ 배양기에서 콜라겐 혼합물을 1시간 동안 고형화시켰다. 트랜스웰 내부와 외부에 각각 DMEM : F12 를 3:1 로 혼합한 배지를 안팎의 수위를 맞추고, 24시간 배양하였다. 진피대응물이 형성된 후, 트랜스웰 내부의 배지를 제거하고, 진피대응물 윗부분을 기저막의 성분인 타입 IV 콜라겐과 라미닌으로 코팅하여 각질세포의 부착을 용이하게 하였다. 콜라겐 0.1 mg/ml 과 라미닌 30 μ g/ml 혼합액 50 μ l 로 37℃ 1시간 동안 반응시켜 표면을 코팅하였다. 코팅액을 제거한 뒤, PBS 완충액으로 3회 세척하였다.

[0052] 각질세포(사람 피부 조직으로부터 초대배양)를 트립신 처리하여 배양 접시로부터 회수한 후 계수하고, 원심분리하여 코팅된 콜라겐 진피위에 5×10^5 세포/well의 농도로 접종하였다. 배지교환은 2-3일에 한번씩 하며 7일 동안 배양하였다. 각질세포가 진피대응물의 윗부분에 고르게 자라면 표피층이 물과 공기의 접촉면에서 배양이 되도록 표피층 위의 배지를 제거하고, 진피대응물 높이를 맞추어 트랜스웰 인서트 밖에 배지를 넣어주어 14일 동안 공기-건조 상태에서 배양 하였다.

[0053] <제조예 2> 3차원 인공 각막 조직 함유 트랜스웰 상부 챔버(인서트)의 제조

[0054] 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 1형 콜라겐을 각막 섬유아세포(사람 피부 조직으로부터 초대 배양)와 혼합하여 만든 진피층 위에 토끼 각막 유래 상피 세포(초대배양)를 접종하여 배양하는 3차원적 배양법을 사용하였다. 피부 각질세포와는 다르게 각막 상피 세포의 경우 분화되어 각질 형성이 되지 않도록 반-건조 배양 상태를 유지하였다.

[0055] <제조예 3> 3차원 인공 조직과 생체조직의 구조적 유사성 확인

[0056] (1) H&E염색

[0057] H&E 염색은 다음과 같이 실시하였다. 파라핀에 쌓여있는 조직을 $5 \mu\text{m}$ 로 절편하여 슬라이드에 붙인 다음, 슬라이드를 자일렌(xylene)에 10분 동안 반응시켜 조직 주변의 파라핀을 제거하였다. 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 2분씩 순차적으로 처리하여 조직을 수화시키고 수세하였다. 헤마톡실린(Auto Hematoxylin, ResGen)에 5분간 처리하여 핵을 염색하고, 슬라이드를 10분 동안 수세하였고, 70%, 80%, 90% 에탄올에 2분씩 순차적으로 처리하여 조직을 탈수시키고 에오신(Eosin, Sigma)을 5분 동안 처리하여 세포질을 염색한 다음, 95% 에탄올에서 세척을 하고 100% 에탄올을 거쳐 자일렌에 2분동안 처리하였다. 슬라이드의 조직이 있는 부분에 마운팅제(Shandon Synthetic Mountant, Thermo)를 한 방울 떨어뜨린 후 슬라이드커버를 붙여 마운팅하였다.

[0058] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 트랜스웰 인서트에서 배양한 피부와 각막의 H&E 염색을 수행한 결과 정상의 사람 피부조직과 토끼 각막 조직을 3차원적으로 재구성한 구조물과 비교하였을 때, 구조적으로 유사성을 보이고 있음을 확인할 수 있었다(도1, (A) 정상 토끼 각막 조직, (B) 3차원적으로 구성된 토끼의 인공 각막 조직, (C) 정상 사람 피부조직, (D) 3차원적으로 구성된 사람의 인공 피부 조직).

[0059] (2) 면역 조직 화학 염색

[0060] 면역 조직 화학염색은 다음과 같이 실시하였다. 파라핀 절단물 ($5 \mu\text{m}$)에서 파라핀을 제거하고, 면역조직화학 염색 전에 수화시켰다. 염색은 ABC kit(Vector Laboratory, CA)와 DAB kit(Vector Laboratory, CA)를 사용하여 제공된 방법에 따라 실시하였다. 절단물을 Fast Red(Vector Laboratories Inc.)로 카운터염색 하였다. 케라틴 5, 케라틴 10, 사이토케라틴 3/12(abCAM)에 대한 항체 제조자의 추천 농도로 하여 반응시켰다.

[0061] 그 결과를 도 2에 나타내었다. 면역조직화학염색을 수행한 결과, 기저층 주변의 분열이 왕성한 상피세포에서 발현되는 케라틴 5 가 3차원 인공 피부 조직과 3차원 인공 각막 조직에서 모두 강하게 발현하는 것을 확인하였다. 특히, 분화된 피부 각질 세포에서만 발현되는 케라틴 10 의 경우 3차원 인공 피부 조직의 분화된 각질층에서 위치 특이적으로 발현하나, 3차원 인공 각막 조직에서는 발현하지 않았음을 확인하였다. 또한, 각막에서 특이적으로 발현하는 케라틴 3/12 의 경우에는 3차원 인공 피부 조직에서는 발현하지 않고, 3차원 인공 각막 조직에서만 발현하는 것을 확인하였다. 이는 상기 제조예 1, 2 의 재구성된 모델에서 실제의 피부와 각막의 특성을 가지고 있는 것을 확인한 것이다.

[0062] <제조예 4> 모니터링 세포주의 선정 및 배양

[0063] (1) 염증 모델 모니터링 세포주의 선정

[0064] 염증 모델 모니터링 세포주로 생쥐 대식세포주인 RAW264.7세포주를 선택하였다. 생쥐 대식세포주인 RAW264.7세포주를 DMEM에 10% FBS가 있는 배양액에서 배양하였으며, 2-3일에 한번씩 배양액을 교환하였다. 세포가 confluent해지면 0.25% trypsin-EDTA에서 10분간 반응시켜 단일세포로 분리하여 1:20으로 계대배양하였다.

[0065] (2) 알레르기 모델 모니터링 세포주의 선정

[0066] 알레르기 모델 모니터링 세포주로 쥐 비만세포주인 RBL-2H3세포주를 선택하였다. 쥐 비만세포주인 RBL-2H3세포주는 DMEM에 10% FBS가 있는 배양액에서 배양하였으며 2-3일에 한번 씩 배양액을 교환하였다. 세포가 confluent해지면 0.25% trypsin-EDTA에서 10분간 반응시켜 단일세포로 분리하여 1:20으로 계대배양하였다.

[0067] <제조예 5> 모니터링 세포주의 분석 방법

[0068] (1) ELSIA법을 이용한 사이토카인 분석 (IL-6, IL-10, TNF alpha)을 통한 염증 작용 평가

[0069] 세포배양액에 분비되는 사이토카인은 ELISA법으로 정량하였다 (R&D systems, Cat no. DY406, DY417, DY410).

[0070] 먼저 캡처링 항체(IL-6,R&D systems,840171;IL-10,R&D systems,840125; TNF alpha, R&D systems,840143)를 96 웰 플레이트에 넣고 실온에서 1일 반응 시킨후, 워싱 버퍼로 3회 세척하였다. 여기에 1% BSA용액으로 1시간 동안 블로킹시켜 배양액과 반응을 준비하였다. 각 배양액 100 μ l을 넣은 후 2시간 반응시켰다. 2시간 반응 후 워싱 버퍼로 3회 세척한 후 검출용 항체 (IL-6,R&D systems,840172;IL-10,R&D systems,840126; TNF alpha, R&D systems,840144) 100 μ l와 2시간 반응시켰다. 워싱 버퍼로 3회 세척한 후 streptavidin-HRP 100 μ l를 넣고 20분간 반응시킨다. 반응 후 워싱 버퍼로 3회 세척한 후 시약 A와 B를 동량 섞어 100 μ l씩 넣고 20분간 발색시키고 10 nM NaOH를 넣고 반응을 정지한 후 450 nm에서 측정된 값을 표준값에 맞춰 정량하였다.

[0071] (2) β -헥소사미니다제 검정법(β -hexosaminidase assay)을 통한 알레르기 작용 평가

[0072] 쥐 비만세포인 RBL-2H3 세포주를 사용하여 Anti-DNP-IgE에 의해 유도되는 비만세포의 탈과립화를 통해 배양액으로 분비되는 β -헥소사미니다제의 활성도 측정정도를 알레르기 반응으로 평가하였다. 5×10^5 개의 흰쥐 RBL-2H3 세포를 12-웰 플레이트에 배양한 후 약 3시간 후에 염증유발물질인 DNP-IgE를 72.2 ng/ml로 처리하고 16 시간 후에 인산-완충 버퍼 염수(PBS)로 2회 세척한 후, 세포배양액을 1% BSA가 포함된 EBSS로 교체하였다. 그 후 DNP-BSA 150 ng/ml를 30분 동안 처리하여 탈과립화를 유도하고 세포배양액만을 따로 취해 β -헥소사미니다제의 활성도를 측정하였다. 형광은 405 nm에서 측정하였다 (Passante 등 2009).

[0073] (3) 웨스턴 블랏팅을 이용한 iNOS 및 Cox-2 수준 평가

[0074] 웨스턴 블랏팅의 수행을 위해서는 iNOS 와 Cox-2 (Cell Signaling Technology, cat No 2977, 4842), CD 163 (Abcam, ab111250) 은 10%, bcl-xl (Cell Signaling Technology, cat No 2764)와 IL-10 (R&D systems, cat no MAB519), Arginases I (Santa Cruz, cat No sc-18354)는 15% SDS-PAGE를 수행한 후 니트로셀룰로스 페이퍼에 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼된 멤브레인은 5% non-fat dry milk가 포함된 0.1% TBST 용액에서 1시간 블로킹한 후 해당 항체와 2시간 배양하였다.

[0075] 0.1% TBST용액으로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체와 1시간 반응시켰다. 0.1% TBST용액으로 10분간 3회 세척한 millipore의 ECL용액 (Chemiluminescent ECL Detection System cat No 2600) 으로 반응하여 분석하였다.

[0076] <제조예 6> 3차원 인공 조직과 모니터링 세포주의 공동배양시스템의 제조

[0077] (1) 염증 모델을 위한 공동배양시스템의 제조

[0078] 12웰 트랜스웰의 인서트에서 제작된 3차원 인공 피부 조직과 3차원 인공 각막 조직을 각각 RAW264.7세포주가 10%FBS가 포함된 DMEM에 2×10^5 세포로 4시간 전에 접종하였던 12웰 트랜스웰 하부 챔버의 내부에 위치시키고 배양하였다. 반 건조상태로 배양이 끝난 3차원 인공 피부 조직과 3차원 인공 각막 조직에 각각 50 μ l의 10% FBS가 포함된 DMEM을 첨가하였다.

[0079] 이렇게 제조된 3차원 인공 조직과 모니터링 세포주의 공동배양시스템은 도 3과 같은 구조를 나타낸다.

[0080] (2) 알레르기 모델을 위한 공동배양시스템의 제조

[0081] 12웰 트랜스웰 인서트에서 제작된 3차원 인공 피부 조직과 인공 각막 조직을 각각 RBL-2H3 세포주가 10% FBS가 포함된 DMEM에 2×10^5 세포로 4시간 전에 접종하였던 12w웰 트랜스웰 하부 챔버의 내부에 위치시키고 배양하였다. 반 건조상태로 배양이 끝난 3차원 인공 피부 조직과 인공 각막 조직에 각각 50 μ l의 10% FBS가 포함된 DMEM을 첨가하였다.

[0082] 이렇게 제조된 3차원 인공 조직과 모니터링 세포주의 공동배양시스템은 도 3과 같은 구조를 나타낸다.

[0083] 피부는 다양한 자극들을 감지하여 신경계통으로 전달하는 주요 장기이며, 외부 환경과 상호작용하는 인체의 중요한 부위라 할 수 있다. 주로 결합조직에 널리 분포하고 있는 비만세포 (mast cell)는 주로 두드러기와 건선, 아토피피부염, 상처 회복 등의 피부질환의 병태생리에 관여하고 있다. 이러한 비만세포는 면역학적 또는 비 면역학적으로 활성화되어 히스타민 같은 매개물질들의 분비를 촉진시켜 비만세포가 활성화된 부위에 많은 염증세포들을 침윤시키고 혈관확장과 부종, 조직손상을 초래한다. 현재 알레르기 반응은 동물을 이용한 실험이 대부분

이기 때문에 동물 실험을 대체하면서 생체와 유사한 조건으로 in vitro 실험법을 확립하기 위해 알레르기반응 모델을 위한 공동배양시스템을 수립하였다.

[실시에]

<실시에 1> 3차원 인공 조직과 모니터링 세포주의 공동배양시스템의 염증 반응 확인

상기 제조예 6에서 제조한 3차원 인공 조직과 모니터링 세포주의 공동배양시스템의 염증 반응을 확인하기 위하여, 3차원 인공 피부 조직과 인공 각막 조직에 각각 LPS (Sigma, cat No L6893)을 0.5 μ g/ml의 농도로 24시간 처리하여 염증반응을 유도하였다.

(1) 형태학적 변화 관찰

LPS에 의해 유도되는 RAW264.7세포주의 면역 활성화 효과는 먼저 세포의 형태 변화에서 확인할 수 있었다. LPS 처리 후, 트랜스웰 하부 챔버의 세포 배양액 내 RAW264.7 세포주의 형태를 도 4에 나타내었다(도 4, +3D skin: 3차원 인공 피부 조직과 모니터링 세포의 공동배양시스템; +3D cornea: 3차원 인공 각막 조직과 모니터링 세포의 공동배양시스템). LPS의 처리에 의해 RAW264.7 세포주의 세포질에는 대식세포의 활성화 지표로 사용되는 포식작용(phagocytosis)을 나타내는 액포(vacuole) 형성이 증가되어 있음이 확인되었다.

(2) 세포 배양액 내 분비된 사이토카인의 확인

공동배양시스템에서 RAW264.7 세포주의 세포배양액에 분비된 IL-6, IL-10, TNF- α 를 제조예 5에 기재된 바와 같이 ELISA로 정량하여 면역 활성화 효과를 평가하였다. 결과를 도 5에 나타내었다. 그 결과 RAW 264.7 세포주에서와 동일하게 LPS 자극에 의해 IL-6와 IL-10이 분비되고 있음을 확인하였다. 그러나, TNF- α 는 3차원 인공 조직 모델에서 증가되어 있어 LPS의 자극에 의해서 반응하지 않음을 알 수 있었다.

(3) iNOS 및 Cox-2를 통한 염증 반응성 확인

제조예 5에 기재된 방법으로, 공동배양시스템에서 RAW264.7 세포주를 면역 활성화시킨 후 iNOS와 Cox-2의 발현량을 측정하였다. 결과를 도 6에 나타내었다. 그 결과, iNOS와 Cox-2의 발현 정도가 3차원 인공 조직과 공동배양하였을때 감소하는 것을 확인하였다.

염증은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염등의 어떠한 기질적인 변화가 가해질 때, 이에 대해 방어할 수 있도록 다양한 작용기전을 통해 빠르게 활성화되는 숙주의 방어작용으로, 체내 염증 과정에서는 과량의 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E2 (PGE2) 등의 염증인자가 inducible NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase (Cox-2)에 의해 형성된다.

이는 피부의 생체 방어기전이 3차원 인공 조직 모델을 채택한 공동배양시스템에서도 작용하여 염증반응의 정도를 감소시키는 것을 의미하며, 이는 본 발명의 공동배양시스템이 실제 생체 모델에 근접한 기전으로 작동하며, 따라서, 생체 모델에 유사한 실험 모델로 제공될 수 있음을 의미한다.

(4) LPS로 활성화된 RAW264.7 세포주의 특성 확인

제조예 5에 기재된 방법으로, 공동배양시스템에서 RAW264.7 세포주를 면역 활성화시킨 후 Arg1, iNOS, IL-10의 발현량을 측정하였다. 결과를 도 7에 나타내었다.

도 7에서 나타나는 바와 같이, LPS로 면역활성이 진행된 RAW264.7 세포주는 염증반응을 매개하는 iNOS를 발현하지만 동시에 항염증반응을 유도할 수 있는 Arginase I과 IL-10을 동시에 발현 유도시키는 것으로 확인되었다.

공동배양시스템에서 확인한 이러한 사이토카인의 변화는 RAW264.7 대식 세포가 LPS에 의한 면역 활성화 작용으로 피부 특이적으로 존재하는 진피 대식세포(dermal-type macrophage)로 전환되었음을 확인할 수 있었다.

실제 피부는 다양한 자극을 감지하여 신경계통으로 전달하는 주요 장기일 뿐만 아니라 외부의 자극과 유해물질로부터 1차적 보호를 담당하는 내재적 면역기관이다. 이를 위해 피부 자체의 방어기전과 외부로부터 침입하는 면역 유발 물질을 무력화시키는 세포를 포함한다. 그 대표적인 기능을 담당하는 세포가 수지상 세포와 골수에서 유래한 진피 대식세포이며, 인체 피부에서 수지상세포는 주로 표피에 존재하는 란게르한스 세포 (langerhans cells) 이고, 다른 하나는 진피에 존재하는 진피 대식세포이다.

현재 인공 피부모델 기술은 각질세포층으로 이루어진 표피층과 결합조직인 진피층으로만 이루어져 있어 구조적

으로 유사한 피부층을 재건할 수 있지만 기능적 재건이 불가능하다는 한계가 있었다.

[0101] 본 실험에서, LPS의해 면역 활성화된 RAW 264.7세포주의 특성을 웨스턴블랏팅법으로 분석한 결과 진피 대식세포와 유사하게 변화하였음을 확인할 수 있었다.

[0102] 이는 1차 내재적 면역기관으로써의 피부모델 수립에 있어서 RAW 264.7세포주를 공동배양하거나, LPS로 면역 활성화 시킨 상태에서 해당 시료의 염증 반응을 조사하는 것이 종래의 일반적인 피부모델에서는 고려할 수 없었던 생체내 피부의 면역 반응까지 고려하여 동물실험을 대체할 수 있는 최상의 모델이라는 것을 의미한다. 따라서 LPS 처리한 RAW264.7 세포주는 진피대식세포층을 대체할 수 있는 모델이 된다.

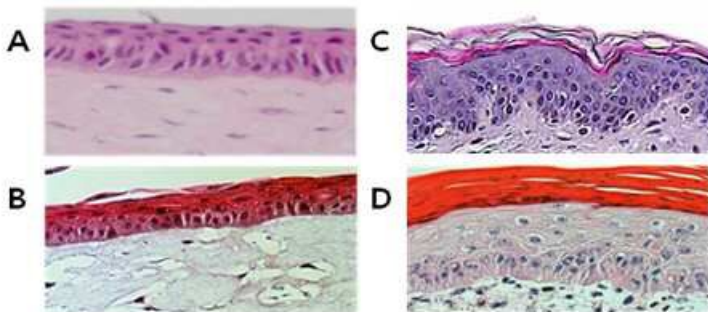
[0103] 즉, 본 발명의 공동배양시스템이 생체 피부와 기능적 유사성을 나타냄이 확인되었으며, 이러한 기능적 유사성에 관한 이해를 돕기 위해 도 8를 첨부하였다.

[0104] <실시예 2> 3차원 인공 조직과 모니터링 세포주의 공동배양시스템의 알레르기 반응 확인

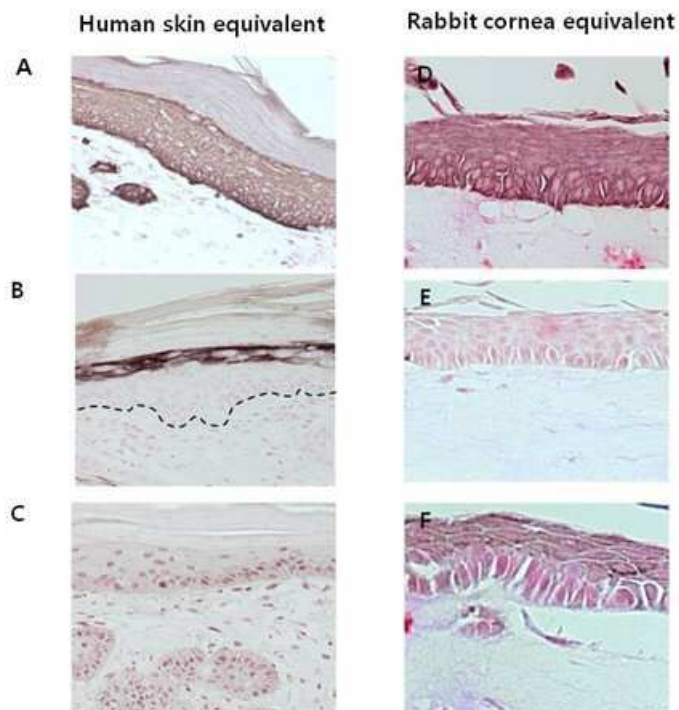
[0105] 상기 제조예 6에서 제조한 3차원 인공 조직과 모니터링 세포주의 공동배양시스템의 알레르기 반응을 확인하기 위하여, 3차원 인공 피부 조직과 인공 각막 조직에 각각 DNP-IgE를 72.2 ng/ml의 농도로 16시간 처리하고 DNP-BSA를 150ng/ml 으로 30분간 처리하여 비만세포의 탈과립화를 유도하고, 탈과립화에 의하여 유리되는 β -헥소사미니다제의 활성을 제조예 5에 기재된 바와 같이 조사하였다. 결과를 도 9에 나타내었다. 그 결과 3차원 인공 피부 조직을 채택한 공동배양시스템에서는 RBL-2H3에서 확인된 β -헥소사미니다제의 활성을 관찰하였으나, 3차원 인공 각막 피부 조직을 채택한 공동배양시스템에서는 알레르기반응이 유도되지 않았다.

도면

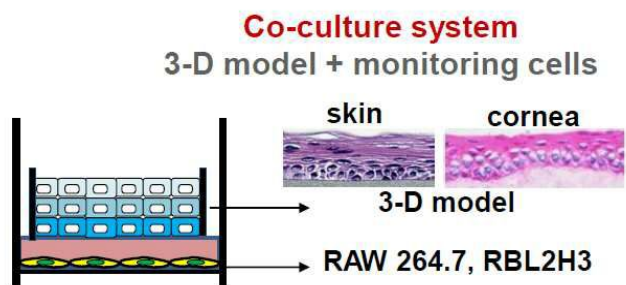
도면1



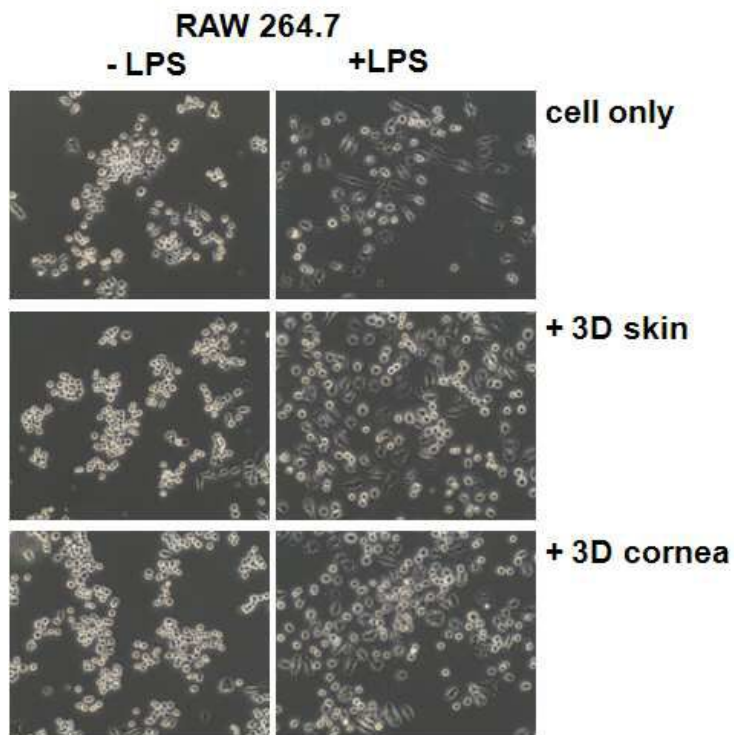
도면2



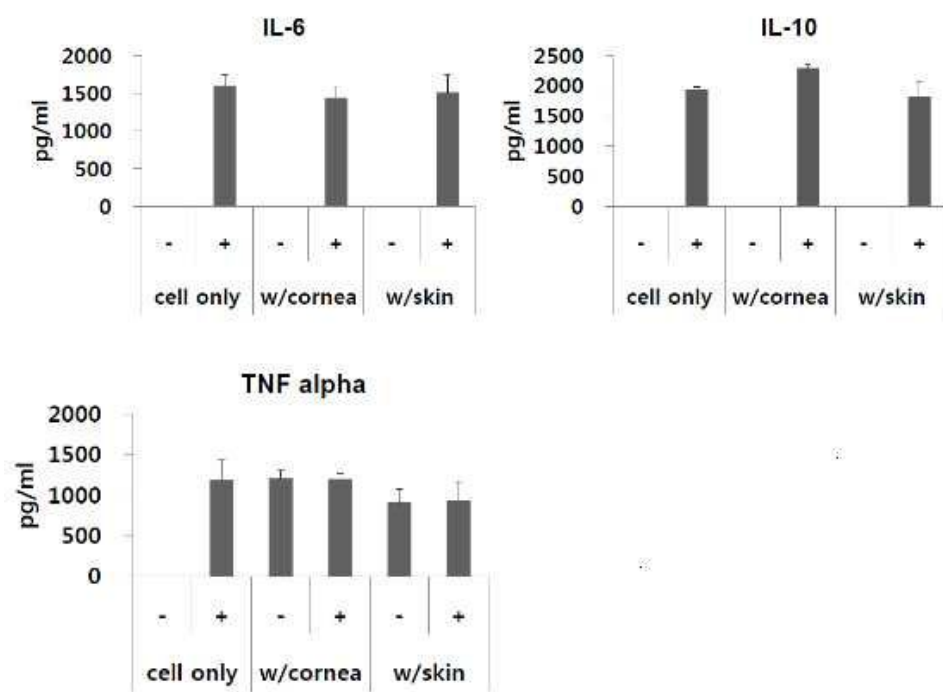
도면3



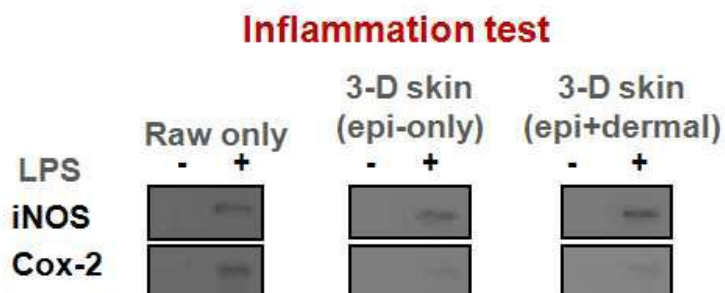
도면4



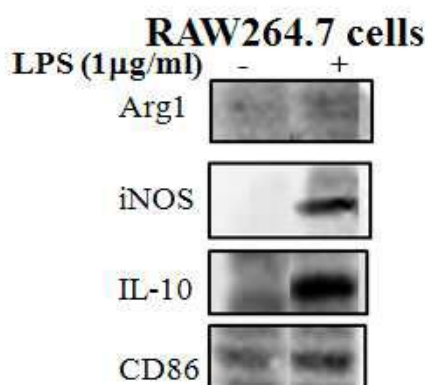
도면5



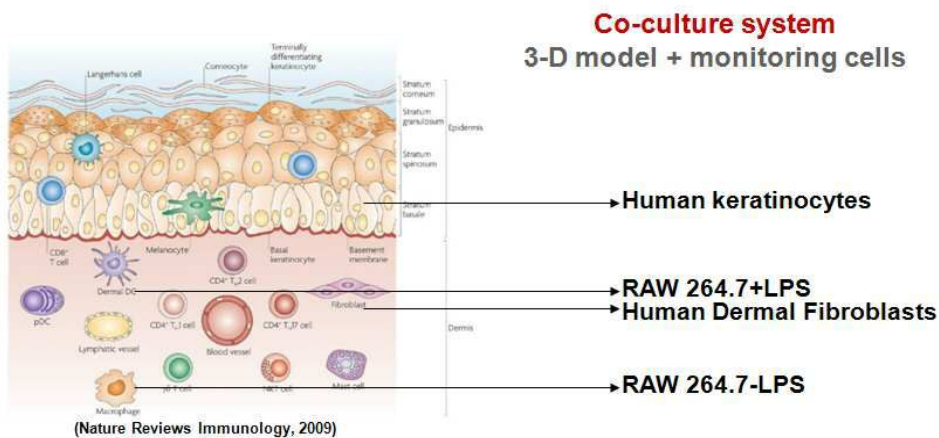
도면6



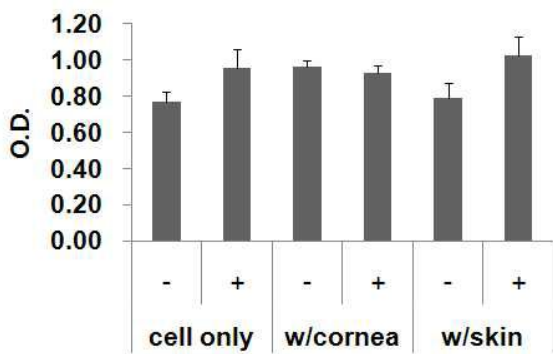
도면7



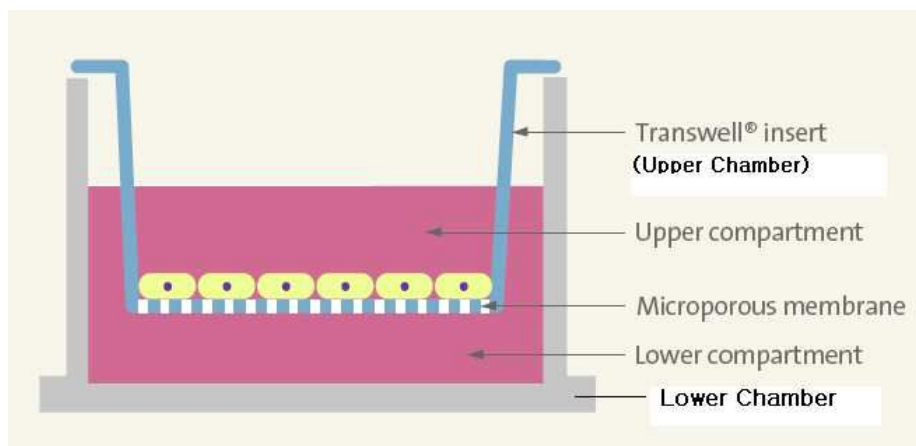
도면8



도면9



도면10



도면11

