



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0036981
(43) 공개일자 2025년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0068 (2013.01)
C12N 5/0657 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0118747
(22) 출원일자 2023년09월07일
심사청구일자 2023년09월07일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
임도선
서울특별시 강남구 선릉로 206, 101동 204호
노지민
대구광역시 동구 화랑로73길 4, 3층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

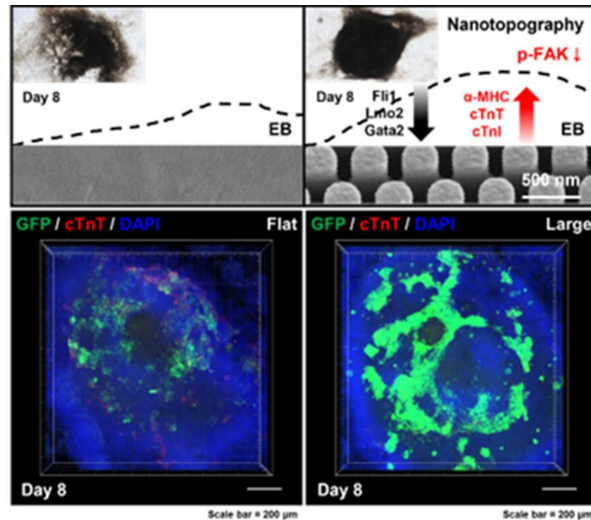
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 나노토포그래피를 이용한 심근세포에서 특정 유전자 또는 단백질의 발현을 조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 성숙화된 심근세포를 획득할 수 있는 최적의 나노토포그래피 표면의 특정 유전자 또는 단백질 발현 조절 용도에 관한 것으로, 본 발명의 특정 직경구배의 나노토포그래피 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에 줄기세포로부터 형성된 배양체를 배양 또는 심근세포로 분화시키면 특정 유전자 또는 단백질의 발현을 증가 또는 감소시키는 효과가 있다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

C12N 2535/00 (2013.01)

(72) 발명자

김대환

서울특별시 용산구 한강대로104라길 17, 101호

송명화

서울특별시 성북구 고려대로12길 7-3, 102호

이규백

서울특별시 성북구 성북로4길 52, 207동 1101호

최룡휘

Room 1203, No. 51, 3333 Lane, Hongxin Road,
Minhang District, Shanghai City

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711131818

과제번호

2019M3A9H1103792

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

바이오·의료기술개발(R&D)

연구과제명

마이크로 심실 오가노이드를 이용한 심근병증 모델링 기술 개발

기 여 율

1/1

과제수행기관명

고려대학교

연구기간

2019.10.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

줄기세포에서 유도된 배양체(Embryoid body)를 280 내지 360 nm의 직경구배의 나노토포그래피 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에서 배양하는 단계를 포함하는, 시험관 내(*in vitro*)의 심근세포에서 빈쿨린(Vinculin), 액티닌(actinin), α -MHC(Myosin Heavy Chain Alpha), cTnT(Cardiac Troponin T) 또는 cTnI(Cardiac troponin I)의 발현을 증가시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 나노패턴 배양접시는 200 내지 500 nm의 높이(Height) 및 80 내지 240 nm의 간격(Spacing)의 나노패턴의 나노토포그래피 표면을 가지는 배양접시인, 시험관 내의 심근세포에서 빈쿨린, 액티닌, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시키는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 나노패턴 배양접시는 직경이 일정하게 증가하고, 간격이 일정하게 감소하는 이중구배의 나노토포그래피 표면을 가지는, 시험관 내의 심근세포에서 빈쿨린, 액티닌, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시키는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 배양체를 나노패턴 배양접시에서 6 내지 10일 동안 배양하는, 시험관 내의 심근세포에서 빈쿨린, 액티닌, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시키는 방법.

청구항 5

줄기세포에서 유도된 배양체를 280 내지 360 nm의 직경구배의 나노패턴 배양접시에서 배양하는 단계를 포함하는, 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK(phospho-Focal adhesion kinase), Fli1(Friend leukemia virus integration 1), Lmo2(LIM domain only 2) 또는 Gata2(GATA Binding Protein 2)의 발현을 감소시키는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 나노패턴 배양접시는 200 내지 500 nm의 높이(Height) 및 80 내지 240 nm의 간격(Spacing)의 나노패턴의 나노토포그래피 표면을 가지는 배양접시인, 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK, Fli1, Lmo2 또는 Gata2의 발현을 감소시키는 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 나노패턴 배양접시는 직경이 일정하게 증가하고, 간격이 일정하게 감소하는 이중구배의 나노토포그래피 표면을 가지는, 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK, Fli1, Lmo2 또는 Gata2의 발현을 감소시키는 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 배양체를 나노패턴 배양접시에서 6 내지 10일 동안 배양하는, 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK, Fli1, Lmo2 또는 Gata2의 발현을 감소시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 성숙화된 심근세포를 획득할 수 있는 최적의 나노토포그래피 표면의 특정 유전자 또는 단백질 발현

조절 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 허혈성 심장질환은 전세계적으로 매우 높은 유병률을 보이고 있으며, 단일질환 전체 사망원인 중 1위를 차지하고 있다. 한국 역시 사회·경제적인 발전과 서구화된 생활습관으로 인하여 허혈성 심장질환 환자들이 급증하고 있다. 더욱이 중증의 말기 심부전 환자의 경우, 심장이식술이나 기계적 좌심실 보조장치 이외에는 완치법이 없는 실정이다. 하지만 공여장기의 부족, 장기확보의 어려움, 높은 사망률 및 고가의 치료비용 등의 문제점을 가지고 있다. 인체의 손상된 조직을 재건하기 위한 이식방법에는 이종이식, 동종이식, 자가이식이 있다. 이종이식은 면역 부적합성 및 레트로바이러스를 포함하는 인수공통 병원체 전달의 문제를 갖는다. 또한, 동종이식은 제 공자의 면역거부 및 이용불가능성의 문제를 가지며, 자가이식은 필요한 양만큼의 적절한 조직을 얻기 어려우며 환자에 대한 외상의 증가의 문제를 가진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 인공 대체물이나 세포를 배양하여 조직화시킨 것을 그대로 이식하려고 하는 기술이 주목받고 있다. 2004년 순수한 세포 자체를 이용하여 제작한 셀 시트(cell sheet)를 이용한 망막 재생에 관한 연구가 New England journal of Medicine에 발표된 뒤 조직공학 분야에서 세포만을 이용한 3차원 인공조직에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 한편, 줄기세포란 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 미분화 세포로서 분화환경에 따라 특정 세포로 분화할 수 있기 때문에 다양한 난치병 예방 및 치료목적의 줄기세포 이용 가능성이 높아지고 있다. 서구화된 식습관, 운동부족 및 노년층의 증가로 인하여 전 세계적으로 급격히 증가하고 있는 급성심근경색과 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 전 무한 실정이다. 특히 성숙한 심근세포는 증식률이 매우 미미하기 때문에 줄기세포로부터 분화를 유도하여 심근 세포를 확보하는 과정이 필수적이다. 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 형태 변화 관찰 및 신경세포로의 분화유도 수준으로 현재, 심근세포의 분화를 위한 최적화된 나노 패턴의 연구가 미흡한 실정이다 (Z.Z. Wu et al., Biotechnol Bioeng., 1:106, 2010; L. Qi et al., PLoSOne, 8:3, 2013). 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 배양체(Embryoid body)를 형성한 후 일반 배양접시에 부착하여 분화를 유도하였기 때문에 분화 후 실질적인 심근세포의 수율이 전체 세포의 5% 미만으로 보고되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 시험관 내의 심근세포에서 빈쿨린, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0005] 아울러, 본 발명의 목적은 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK, Fli1, Lmo2 또는 Gata2의 발현을 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 줄기세포에서 유도된 배양체를 특정 직경구배의 나노토포그래피 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에서 배양하는 단계를 포함하는, 시험관 내의 심근세포에서 빈쿨린, 액티닌, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0007] 아울러, 본 발명은 줄기세포에서 유도된 배양체를 특정 직경구배의 나노토포그래피 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에서 배양하는 단계를 포함하는, 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK, Fli1, Lmo2 또는 Gata2의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 특정 직경구배의 나노토포그래피 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에 줄기세포로부터 형성된 배양체를 배양 또는 심근세포로 분화시키면 특정 유전자 또는 단백질의 발현을 증가 또는 감소시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009]

도 1은 랫의 자궁조직의 자궁내막 섬모의 나노토포그래피를 SEM으로 관찰한 도이다.

도 2는 랫의 심장조직의 나노토포그래피를 SEM으로 관찰한 도이다.

도 3은 본 발명의 나노토포그래피 표면의 나노패턴 형상, 단면의 형상 및 나노 기둥의 직경구배를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 나노스케일의 토포그래피 표면의 나노패턴 배양접시를 SEM으로 관찰한 도이다.

도 5는 본 발명의 나노스케일의 토포그래피 표면의 나노패턴 배양접시의 나노패턴 크기를 확인한 표를 나타낸 도이다.

도 6은 마우스 배아 줄기세포주로부터 형성한 배양체의 배양체 형성 1일 및 2일차의 형태 (A), 및 지름 및 둘레 (B 및 C)를 나타낸 도이다.

도 7은 마우스 배아 줄기세포주로부터 배양체 형성 및 이를 다양한 나노토포그래피(nanotopography) 표면의 배양접시에서 심근세포로 분화시키는 과정을 나타낸 도이다.

도 8은 다양한 나노토포그래피 표면의 배양접시에서 배양체를 배양하여 분화시 날짜에 따른 배양체 형태를 확인한 도이다.

도 9는 평면(Flat) 또는 대형(Large) 나노토포그래피 조건으로 배양체를 배양하여 분화시킨 심근세포에서 박동 영역 및 GFP 발현 영역 (A), 이의 정량화 그래프 (B), 및 근절 형성 (C)을 분석한 도이다.

도 10은 평면(Flat) 또는 대형(Large) 나노토포그래피 조건으로 배양체를 배양하여 분화시킨 심근세포에서 GFP 발현 및 박동 (A), 살아있는 GFP+ 심근세포의 백분율 (B) 및 이의 정량화 그래프 (C)를 나타낸 도이다.

도 11은 평면(Flat) 또는 대형(Large) 나노토포그래피 조건으로 배양체를 배양하여 분화시킨 심근세포에서 심장 마커, 내피세포 마커 및 평활근 세포 마커 유전자의 발현을 분석한 도이다.

도 12는 평면(Flat) 또는 대형(Large) 나노토포그래피 조건으로 배양체를 배양하여 분화시킨 심근세포에서 Vinculin의 발현을 확인한 도이다.

도 13은 평면(Flat) 또는 대형(Large) 나노토포그래피 조건으로 배양체를 배양하여 분화시킨 심근세포에서 배양체의 부착 및 접합을 TEM으로 확인한 이미지 (A 및 B) 및 p-FAK의 발현 (C)을 확인한 도이다.

도 14는 FAK 신호 조절을 통해 본 발명의 특정 나노토포그래피 패턴 표면이 심장 형성 및 심근세포의 성숙 촉진 효과를 가지는지 확인한 도이다:

A: FAK 억제한 배양체의 분화 8일차 이미지; 및

B: GFP 및 액티닌(actinin) 발현.

도 15는 본 발명의 특정 직경의 크기를 가지는 대형 나노토포그래피가 FAK 신호를 통해 심장 형성을 조절하는 역할을 수행하여 심장 형성 및 성숙을 촉진한 것을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010]

이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0011]

또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [0012] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0014] 일 측면에서, 본 발명은 빈쿨린(Vinculin) 단백질, 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 빈쿨린 단백질 발현 촉진제 또는 빈쿨린 단백질 활성화제를 유효성분으로 포함하는 심근세포 분화 촉진용 또는 성숙화용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 일 구현예에서, 상기 조성물은 심근세포에서 액티닌, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0016] 일 구현예에서, 상기 조성물은 심근세포에서 p-FAK(phospho-Focal adhesion kinase), Fli1, Lmo2 또는 Gata2의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0017] 일 측면에서, 본 발명은 FAK의 활성 억제제 또는 인산화 억제제를 유효성분으로 포함하는 심근세포 분화 촉진용 또는 성숙화용 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 일 구현예에서, 상기 조성물은 심근세포에서 빈쿨린, 액티닌, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0019] 일 구현예에서, 상기 조성물은 심근세포에서 Fli1, Lmo2 또는 Gata2의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0020] 일 측면에서, 본 발명은 줄기세포에서 유도된 배양체(Embryoid body)를 280 내지 360 nm의 직경구배 (직경의 크기가 점점 작아지거나 커지는 구배패턴)의 나노토포그래피 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에서 배양하는 단계를 포함하는, 시험관 내(*in vitro*)의 심근세포에서 빈쿨린(Vinculin), 액티닌, α -MHC, cTnT 또는 cTnI의 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0021] 일 구현예에서, 상기 방법은 시험관 내의 심근세포에서 빈쿨린의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0022] 일 구현예에서, 상기 방법은 시험관 내의 심근세포에서 빈쿨린, 액티닌, α -MHC, cTnT 및 cTnI의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0023] 일 구현예에서, 상기 배양체는 현적배양(hanging drop culture), 스피너 플라스크 배양(spinner flask culture), 반구형 마이크로웰 플레이트(concave microwell plate)를 이용한 삼차원 세포배양 등 입체 형태로 배양체를 형성할 수 있는 방법을 이용하여 유도될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 현적배양 방법으로 줄기세포로부터 배양체를 형성/제작하여 심근세포로 분화를 유도하였으나, 세포 비부착성 배양접시를 사용하여 배양체를 배양하거나 또는 일반 배양접시 표면을 코팅하여 세포 부착을 저해하여 배양체를 배양하여도 무방하다.
- [0024] 일 구현예에서, 상기 방법은 심근세포의 성숙도를 증가시킬 수 있다.
- [0025] 일 구현예에서, 상기 나노패턴은 원통형 또는 돌기형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 패턴으로 될 수 있는 어떤 형태라도 사용 가능하다.
- [0026] 일 구현예에서, 상기 나노패턴 배양접시는 200 내지 500 nm의 높이(Height) 및 80 내지 240 nm의 간격(Spacing)의 나노패턴의 나노토포그래피 표면을 가질 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 상기 나노패턴 배양접시는 직경이 일정하게 증가하고, 간격이 일정하게 감소하는 이중구배의 나노토포그래피 표면을 가질 수 있다.
- [0028] 일 구현예에서, 상기 줄기세포는 다능성 줄기세포일 수 있으며, 배아 줄기세포(Embryonic Stem Cell, ESC), 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 또는 성체 줄기세포(adult stem cell)일 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 상기 배양체를 나노패턴 배양접시에서 6 내지 10일 동안 배양하여 심근세포로 분화시킬 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 상기 발현은 유전자 또는 단백질의 발현일 수 있다.
- [0031] 일 측면에서, 본 발명은 줄기세포에서 유도된 배양체를 280 내지 360 nm의 직경구배의 나노패턴 배양접시에서 배양하는 단계를 포함하는, 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK(phospho-Focal adhesion kinase), Fli1, Lmo2 또

는 Gata2의 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

- [0032] 일 구현예에서, 상기 방법은 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서, 상기 방법은 시험관 내의 심근세포에서 p-FAK, Flil, Lmo2 및 Gata2의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0034] 일 구현예에서, 상기 배양체를 나노패턴 배양접시에서 6 내지 10일 동안 배양하여 심근세포로 분화시킬 수 있다.
- [0035] 일 구현예에서, 상기 발현은 유전자 또는 단백질의 발현일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용된 용어, "줄기세포(stem cell)"는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 미분화 세포들을 지칭한다. 줄기세포는 발달 가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.
- [0037] 본 발명에서 사용된 용어, "중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)"는 인간을 포함한 포유동물, 바람직하게는 인간의 성체 세포로부터 유래된 중복성(multipotency)을 갖는 미분화 세포를 말하며, 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 중간엽 줄기세포는, 예를 들어, 장막, 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방(즉, 지방조직 또는 지방세포), 제대혈, 제대의 바르톤 젤리(Wharton's jelly) 등의 다양한 성체 세포로부터 유래될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용된 용어, "분화 (Differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 특별한 기능을 갖는 특정한 세포나 조직의 복합체 또는 개체의 수준으로 변해가는 것을 말한다.
- [0039] 본 발명에서 사용된 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.
- [0040] 본 발명에서 사용된 용어, "나노패턴(Nanopattern)"은 나노 단위의 돌기가 균일하게 배열되어 있는 것을 말하며, 줄기세포능을 갖는 줄기세포를 지속적으로 배양하기 위한 목적으로 제작하였다. 나노패턴은 체내 조직 표면의 나노토포그래피를 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.
- [0041] 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.
- [0042] 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 세포부착능을 향상시킬 수 있는 물질이면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0044] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0046] **실시예 1. 배아 발달에서 나노스케일 토포그래피의 중요성 확인**
- [0047] 나노스케일의 토포그래피가 배아 발달에 중요한지 확인하기 위해, 주사전자현미경(SEM)을 사용하여 *ex vivo* 랫

의 자궁조직과 심장조직의 미세구조를 분석하였다. 구체적으로, 임신한 Sprague-Dawley 랫의 8주령 자궁조직 및 심장조직을 각각 2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 용액으로 4℃에서 밤새 고정하였다. 각 샘플을 PBS로 2번 세척한 후, 실온에서 1시간 동안 1% 사산화오스뮴(osmium tetroxide) 용액으로 처리하고 PBS로 2번 세척한 뒤, 50%-100% 에탄올 농도구배로 탈수하였다. 각 샘플을 실온에서 15분 동안 HMDS(hexamethyldisilazane; 440191; Sigma-Aldrich)로 고정하거나 동결건조한 뒤 5분 동안 백금으로 코팅하였다.

[0048] 그 결과, 임신 3.5일째 자궁조직의 자궁내막 표면에 부착된 수정란 및 수정란의 부착을 위한 자궁내막 섬모의 나노토포그래피가 관찰되었다 (도 1). 또한, 성체 랫 심장조직의 SEM 이미지에서 50 및 440 nm의 직경을 가지는 잘 배열된 나노섬유가 관찰되었다 (도 2A 및 B). 이를 정량 분석한 결과, 나노섬유들이 50-450 nm 범위의 다양한 직경을 가지는 것으로 나타났다 (도 2C).

[0050] 이를 통해, 세포외 기질의 배열된 구조 또는 나노토포그래피 지향성 특징이 특정 세포-표면 상호작용을 통해 줄기세포의 잠재력을 조절할 수 있는 것을 확인하였다. 따라서, 나노스케일의 토포그래피가 배아 발달에 중요할 것으로 유추되었다.

[0052] 실시예 2. 나노패턴 배양접시 제작

[0053] 배아 발달에 나노스케일의 토포그래피가 중요하므로, 특정한 나노기공 직경구배를 가지며, 친수성 표면 개질을 통해 적절한 배양 환경을 제공하는 나노패턴 배양접시를 제작하기 위해, 3가지의 직경구배 (대형: 280-360 nm; 중형: 200-280 nm; 및 소형: 120-200 nm)의 나노토포그래피 표면을 가지는, 배양체 분화용 나노패턴 배양접시를 제작하였다. 구체적으로, 초고순도 알루미늄 판 (99.999%, 300 x 300 x 1)을 와이어방전가공법을 이용하여 가로 20 mm, 세로 50 mm, 높이 1 mm의 형태로 절삭한 뒤, 에틸알코올과 과염소산을 4:1 비율로 혼합한 용액에 넣고, 7℃에서 10분간 20 V의 전압을 가하여 전해연마하였다. 전해연마된 알루미늄 판을 메틸알코올, 물 및 85% 인산이 59:40:1 비율로 혼합한 전해액에 넣고 -10℃에서 16시간 동안 195 V의 전압을 가하여 1차 산화알루미늄막을 형성한 뒤, 1차 산화알루미늄 막을 65℃의 180 mM 크롬산용액에 10시간 이상 담가 제거하고, 1차 산화알루미늄막 제조시와 동일한 조건으로 6시간 동안 전압을 가하여 잘 정렬된 나노기공을 가지는 2차 산화알루미늄막을 생성하였다. 2차 산화알루미늄 막이 형성된 알루미늄 판을 선형 이동장치에 부착하고, 30℃의 100 mM 인산 식각용액에 4.86 $\mu\text{m/s}$ 의 속도로 점진적으로 담가 나노기공을 직경구배를 가지도록 식각하였다. 나노기공 직경구배가 형성된 알루미늄 판을 선형 이동장치로부터 분리하여, 120 내지 200 nm, 200 내지 280 nm 및 280 내지 360 nm의 나노기공 직경 구배를 가지는 알루미늄 판을 각각 제작하고, 이를 30℃ 인산 식각용액에 2시간 또는 4시간 동안 침지하여 3가지 나노기공 직경구배 (대형: 280-360 nm; 중형: 200-280 nm; 및 소형: 120-200 nm)의 그래디언트 나노필러 표면을 가지는 알루미늄판을 제작하였다 (도 3 및 도 4). 제작한 각 알루미늄판을 폴리스타이렌 판 위에 고정시키고, 나노각인 장치를 사용하여 압력을 가하여 폴리스타이렌 나노패턴을 형성하였다. 이렇게 제작된 폴리스타이렌 나노패턴은 톨루엔을 사용하여 $\phi 60$ 폴리스타이렌 페트리접시 바닥에 고정시키고, 산소 플라즈마 처리를 통해 표면을 친수성으로 개질하여 나노패턴 배양접시를 제작하고, 이의 나노 패턴의 크기를 확인하였다 (도 5). 알루미늄 판의 소수성 자가조립 단분자막을 형성하여 나노패턴 배양접시를 완전멸균한 뒤, Tyvek 파우치에 보관하였다.

[0055] 실시예 3. 나노패턴 배양접시에서 배양체(Embryoid body)의 분화 유도

[0056] 3-1. 배양체 배양 조건 수립

[0057] 본 발명의 나노토포그래피의 직경에 따라 배양체의 심근형성이 영향을 받는지 확인하기 위해, 알파-미오신 중쇄(α -Myosin heavy chain; α -MHC) 프로모터 21이 활성화되면 eGFP(Enhanced green fluorescence protein)이 발현되는 세포주인 EMG7 마우스 배아 줄기세포주를 현적배양(hanging drop) 방법으로 2일 동안 배양하여 배양체를 형성하고, 배양체 형성 1일 후 및 2일 후에 배양체의 지름과 둘레를 측정하였다 (도 6A).

[0058] 그 결과, 20 mL의 부피에 3×10^3 개의 ESC를 사용하여 배양체가 심근세포의 분화가 증가한다고 알려진 배양체의 지름인 300-450 μm 에 속하는 약 400 μm 의 지름을 갖는 것으로 나타났다 (도 6B 및 C).

[0060] 3-2. 나노패턴 배양접시의 직경에 따른 심근 분화 분석

[0061] 나노패턴 배양접시의 그라디언트 나노필러 표면에 따른 배양체의 심근 분화 정도를 확인하기 위해, 상기 실시예 3-1에서 2일 동안 형성한 배양체를 평면 배양접시 (대조군), 실시예 2에서 제작한 소형, 중형 및 대형의 그라디언트 나노필러 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에 각각 옮긴 후, 8일 동안 배양하여 심근 분화를 유도하고 (도 7), 이의 형태를 배양 2일, 4일 및 8일차에 관찰하였다. 또한, 배양체의 배양 8일 후, 배양체의 자발적인 심장 분화를 확인하기 위해 박동영역 및 GFP 발현 세포를 관찰하였다. 또한, 배양체를 고정하고 anti-cTnT 항체를 이용하여 심근세포의 구조 및 조직화를 면역형광염색법으로 분석하였다. 아울러, 유세포 분석으로 내인성 GFP-발현 세포를 분리하고, CellQuest Pro 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0062] 그 결과, 평면에서 배양된 배양체는 평면 형태를 유지하는 반면, 본 발명의 나노토포그래피, 즉, 소형, 중형 및 대형의 그라디언트 나노필러 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에서 배양된 배양체의 가장자리가 거의 퍼지지 않는 것으로 나타났으며, 특히, 대형의 그라디언트 나노필러 표면을 가지는 나노패턴 배양접시 (대형 나노토포그래피)에서 배양된 배양체는 평면, 소형 및 중형의 나노토포그래피에서 배양된 배양체보다 더 조밀한 형태를 나타냈다 (도 8). 또한, 대형의 그라디언트 나노필러 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에서 배양/분화한 배양체가 가장 넓은 박동영역 및 GFP 발현 영역을 나타냈으며 (도 9A), GFP 발현 영역을 정량화한 결과, 대형 나노토포그래피에서 가장 넓게 나타났다 (도 9B). 면역형광 이미지를 콘포칼 현미경으로 확인한 결과, 대형의 그라디언트 나노필러 표면을 가지는 나노패턴 배양접시에서 배양된 배양체는 평면, 소형 및 중형의 나노토포그래피에서 분화(배양)된 배양체에 비해 매우 조직화된 근절 형성을 나타냈다 (도 9C). 또한, 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체는 높은 GFP 발현 및 리드미컬한 박동을 나타냈다 (도 10A). 아울러, 유세포 분석으로 분리한 살아있는 GFP+ 심근세포의 백분율은 평면 표면에 비해 본 발명의 대형 나노토포그래피에서 매우 높은 비율을 나타냈으며 (도 10B), 정량화한 결과, 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체의 GFP+ 심근세포는 평면 표면에 비해 약 1.542배 높은 것으로 나타났다 (도 10C).

[0064] 이를 통해, 본 발명의 대형 나노토포그래피, 즉, 280-360 nm의 그라디언트 나노필러 표면을 가지는 나노패턴 배양접시가 배양체의 심근 분화 및 심장 성숙을 증진시키는 데 유리하며, 배양체의 심장생성을 유의적으로 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0066] 실시예 4. 심장 분화 및 조혈 분화에 대한 유전자 발현 분석

[0067] 본 발명의 대형 나노토포그래피 (280-360 nm의 그라디언트 나노필러 표면을 가지는 나노패턴 배양접시)가 배양체 분화 및 조혈 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 심장 분화 및 조혈 분화에 대한 특이적 마커의 유전자 발현 수준을 중합효소연쇄반응을 통해 조사하였다. 구체적으로, 평면 또는 대형 나노토포그래피에서 8일 동안 배양된 배양체 샘플을 트리졸(TRIZOL)을 사용하여 메신저 RNA(mRNA)를 추출하고, 추출된 mRNA의 농도를 나노드롭 분광계를 이용하여 측정하였다. 500 ng의 mRNA를 RNase 억제제 및 M-MLV 역전사효소를 사용하여 37℃에서 50분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 중합효소연쇄반응은 iQ SYBR Green Supermix를 사용하여 수행하였으며, MyiQ2 RT-PCR Detection System을 이용하여 결과를 획득하였다.

[0068] 그 결과, 배양체의 분화 8일차에, 대형 나노토포그래피 조건으로 배양된 배양체에서 심장 마커인 α -MHC, cTnT 및 cTnI의 발현이 증가하는 것으로 나타났다 (도 11A). 반면, 내피세포 마커인 CD31 및 CD144, 및 평활근 세포 마커인 SMA의 발현에는 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 11B).

[0070] 이를 통해, 특정 직경의 나노토포그래피가 배양체의 심장 분화를 촉진하고 조혈 분화를 감소시키는 것을 효과를 가지는 것을 확인하였다.

[0072] 실시예 5. 심장 분화 촉진하는 기전 분석

[0073] 5-1. 빈쿨린(Vinculin) 발현 확인

[0074] 본 발명의 대형 나노토포그래피가 초점접착과 세포 성숙에 관여하는 중요한 세포골격 단백질인 Vinculin의 발현을 조절함으로써 심장 분화를 촉진하는지 확인하였다. 구체적으로, 배양체의 심근세포로의 분화 유도 후 1일 및

2일차에 평면 또는 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체에서 Vinculin의 발현을 면역형광염색법으로 확인하였다.

[0075] 그 결과, 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체에서 Vinculin의 발현이 평면에서 배양된 배양체보다 높은 것으로 나타났다 (도 12). 이를 통해, 특정 직경의 나노토포그래피가 배양체의 심장 분화 초기 단계에서 초점접착 (focal adhesion)을 강화하는 빈쿨린의 발현을 조절함으로써 심장 분화를 촉진하는 것을 확인하였다.

[0077] 5-2. 배양체의 부착과 접합 분석

[0078] 배양체의 심근세포로의 분화 8일차에 평면 및 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체의 부착과 접합을 각각 TEM 이미지를 통해 비교 분석하였다.

[0079] 그 결과, 평면에서 배양된 배양체 뿐만 아니라 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체도 잘 부착되는 것으로 나타났으며 (도 13A), 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체의 세포-세포 간 결합이 잘 형성되는 것을 확인하였다 (도 13B). 또한, p-FAK의 발현은 평면에서 배양된 배양체에 비해 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체에서 더 낮은 수준으로 나타났다 (도 13C). 이를 통해, 본 발명의 대형 나노토포그래피가 배양체의 심근세포로의 분화 과정에서 세포-세포 간의 연결을 조절함으로써 초점접착과 FAK(Focal adhesion kinase) 신호 전달 경로를 조절하고, 이를 통해 심장 형성을 촉진하는 것을 알 수 있다.

[0081] 5-3. FAK 신호 조절을 통한 심장 형성 및 성숙 촉진 효과 확인

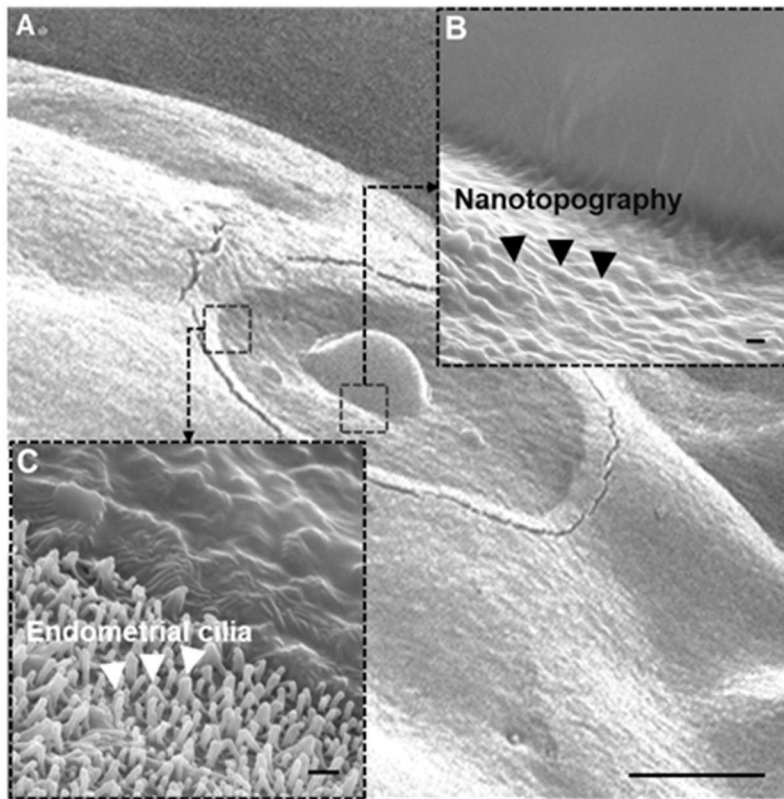
[0082] 본 발명의 대형 나노토포그래피가 초점 접착 성분의 번역 후 변형을 통해 초점 접착 안정화 및 회전에 관여하는 FAK(Focal adhesion kinase)를 통해 배양체의 심근세포로의 분화 및 성숙을 촉진하는지 확인하기 위해, 평면에서 배양된 배양체 및 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체에 FAK를 억제하는 PP2를 분화 유도 8일 동안 2일 간 배양액을 교체하면서 각각 처리하고 분화 유도 8일차에 세포의 형태를 분석하고, GFP 및 액티닌(actinin)의 발현을 형광염색 분석으로 확인하였다.

[0083] 그 결과, 분화 8일에 PP2로 처리된 본 발명의 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체는 PP2로 처리된 평면에서 배양된 배양체에 비해 더 조밀한 형태를 나타냈다 (도 14A). 또한, 형광염색 분석 결과, 본 발명의 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체가 평면에서 배양한 대조군 배양체에 비해 GFP 및 액티닌(actinin)을 더 높은 수준으로 발현하는 것으로 나타났다. 따라서 대형 나노토포그래피에서 배양된 배양체의 형태가 FAK 신호 전달을 통해 조절되었음을 알 수 있었으며, 특히, 나노패턴의 특정 직경 범위인 280-360 nm가 배양체에서 p-FAK를 조절하고 심장 형성 및 성숙을 촉진한 것을 확인하였다 (도 14B).

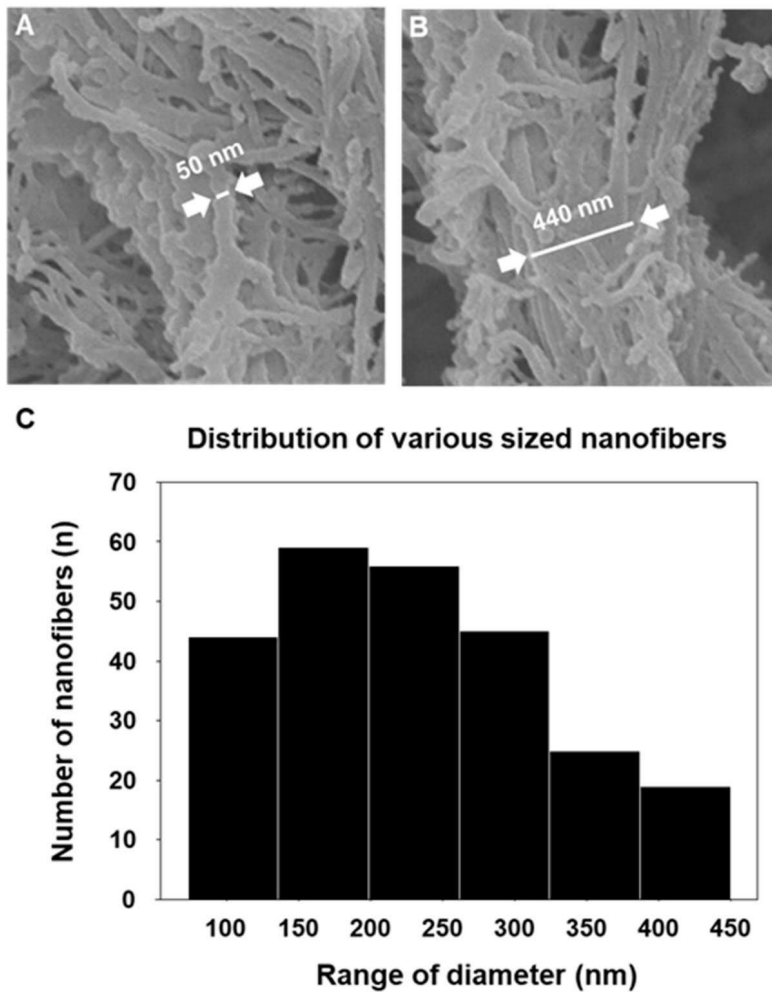
[0085] 이를 통해, 본 발명의 특정 직경의 크기를 가지는 대형 나노토포그래피가 FAK 신호를 통해 심장 형성을 조절하는 역할을 수행하며, 특정 직경 구배를 가지는 그래디언트 나노필러 표면의 나노패턴이 배양체 내에서 p-FAK를 조절하여 심장 형성 및 성숙을 촉진한 것을 확인하였다 (도 15).

도면

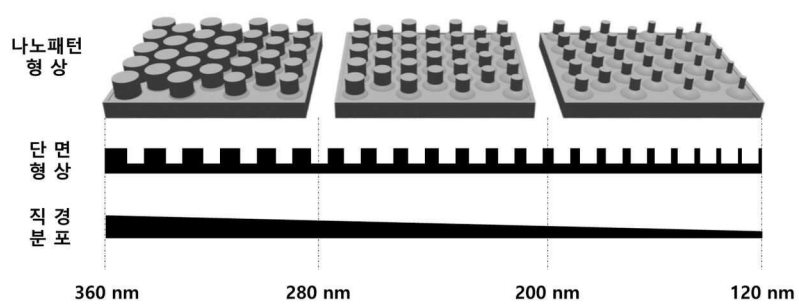
도면1



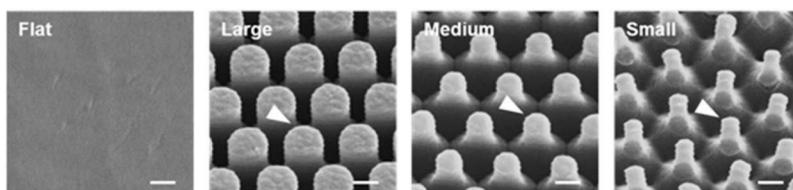
도면2



도면3



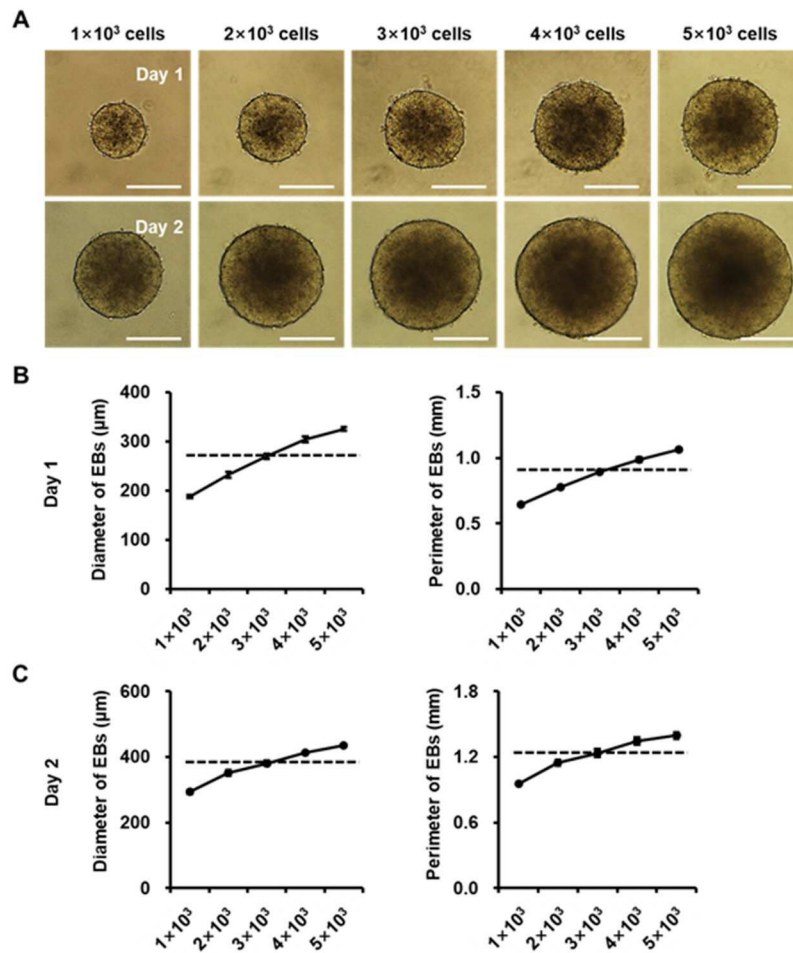
도면4



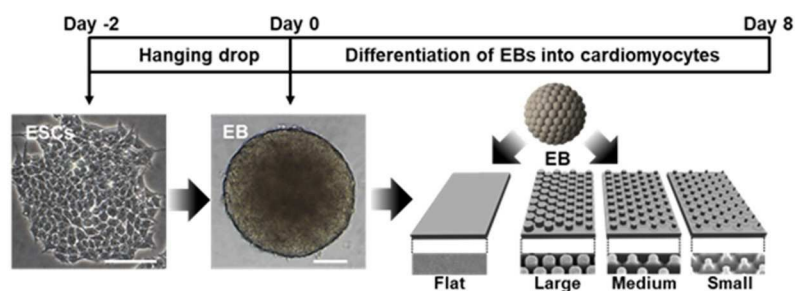
도면5

	Nanopattern type		
	Small	Mid	Large
Nanopillar diameter (nm)			
Minimum	123.3 ± 15.7	205.5 ± 14.0	278.2 ± 16.1
Maximum	212.2 ± 17.1	288.7 ± 16.4	364.1 ± 20.5
Center to center distance (nm)	439.2 ± 23.9	432.9 ± 20.2	437.4 ± 26.5
Nanopillar height (nm)	282.2 ± 12.9	274.8 ± 24.4	279.6 ± 32.1

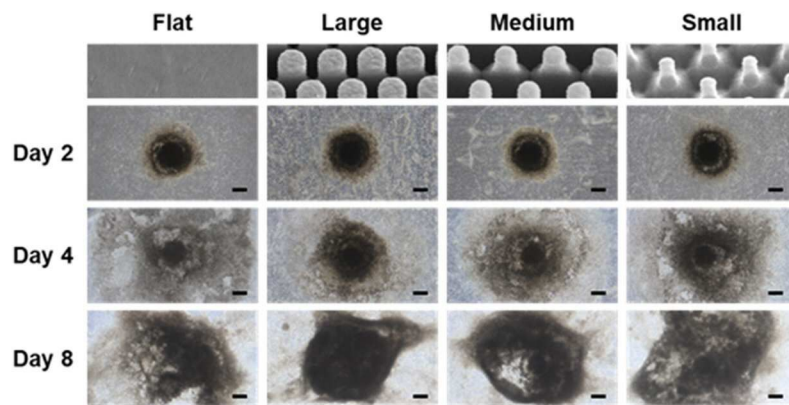
도면6



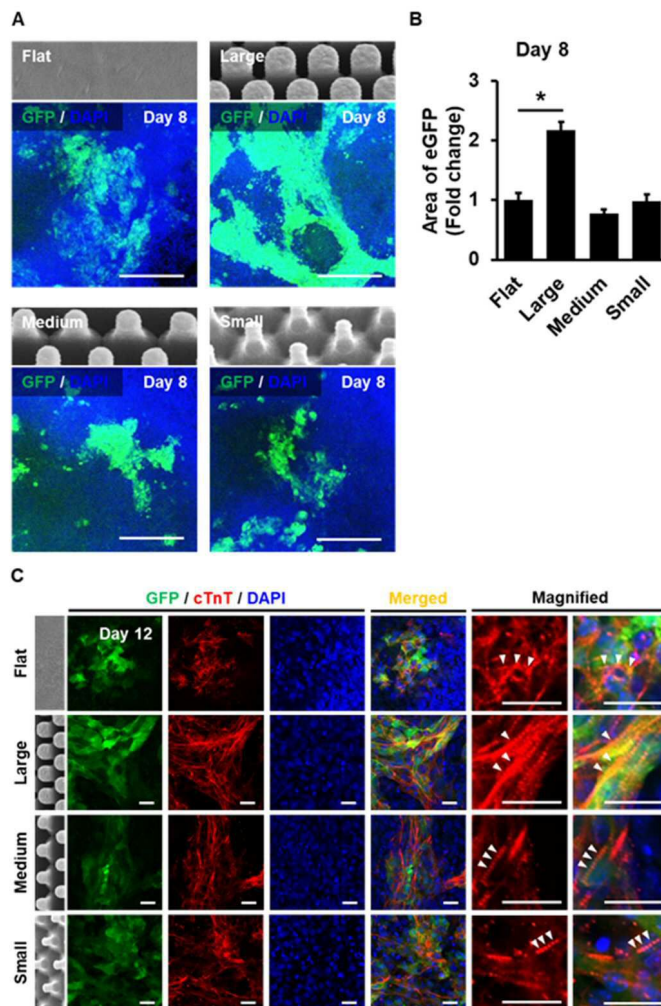
도면7



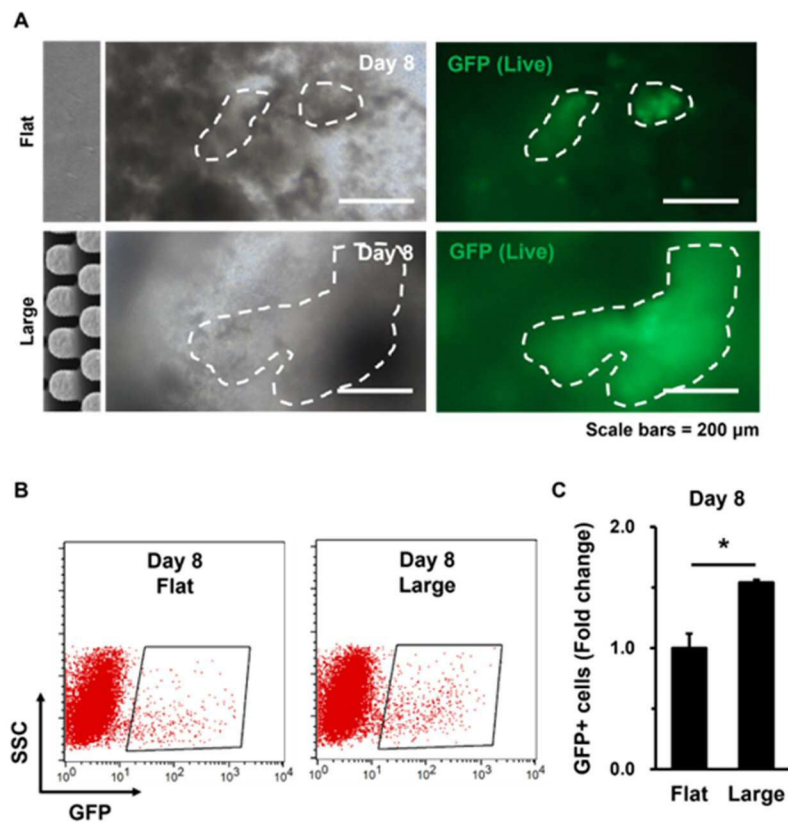
도면8



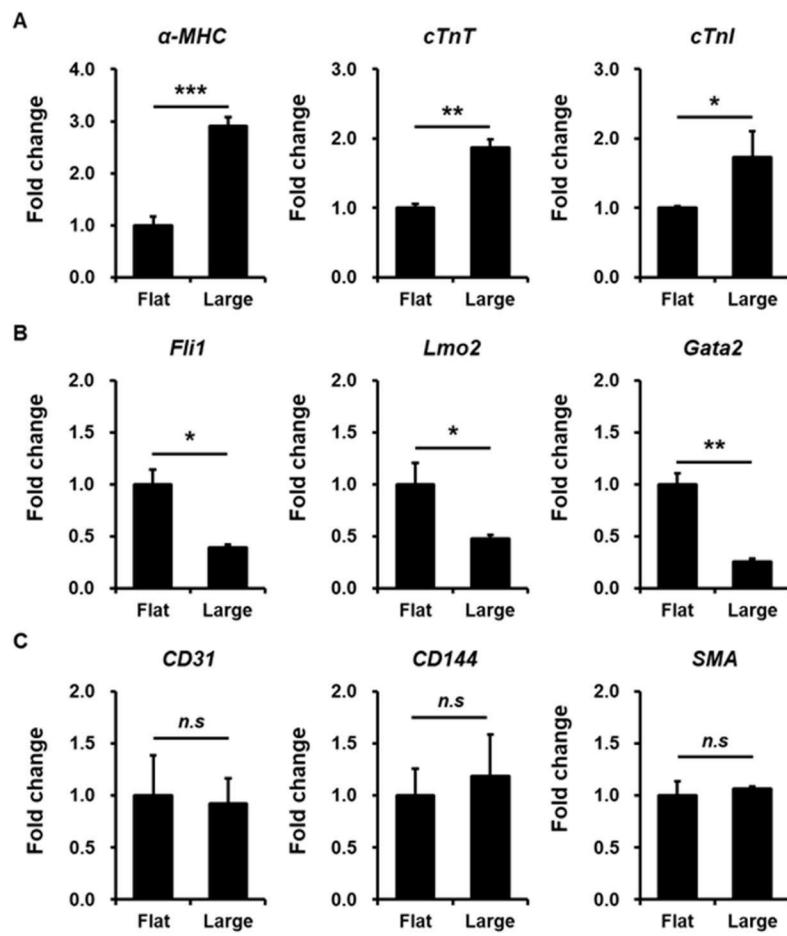
도면9



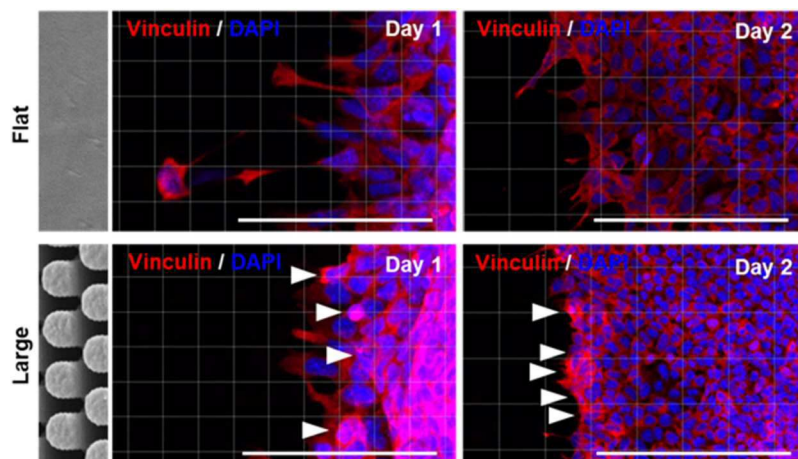
도면10



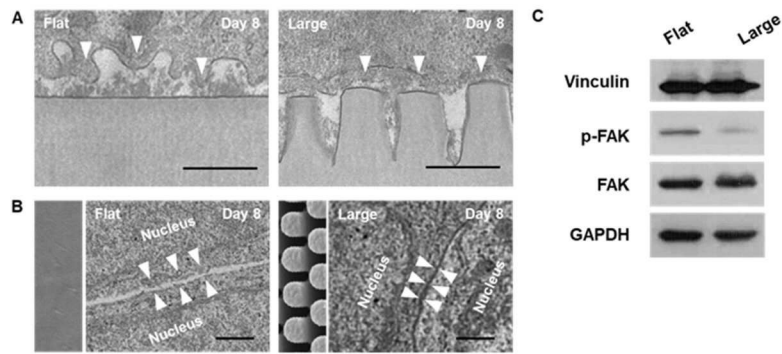
도면11



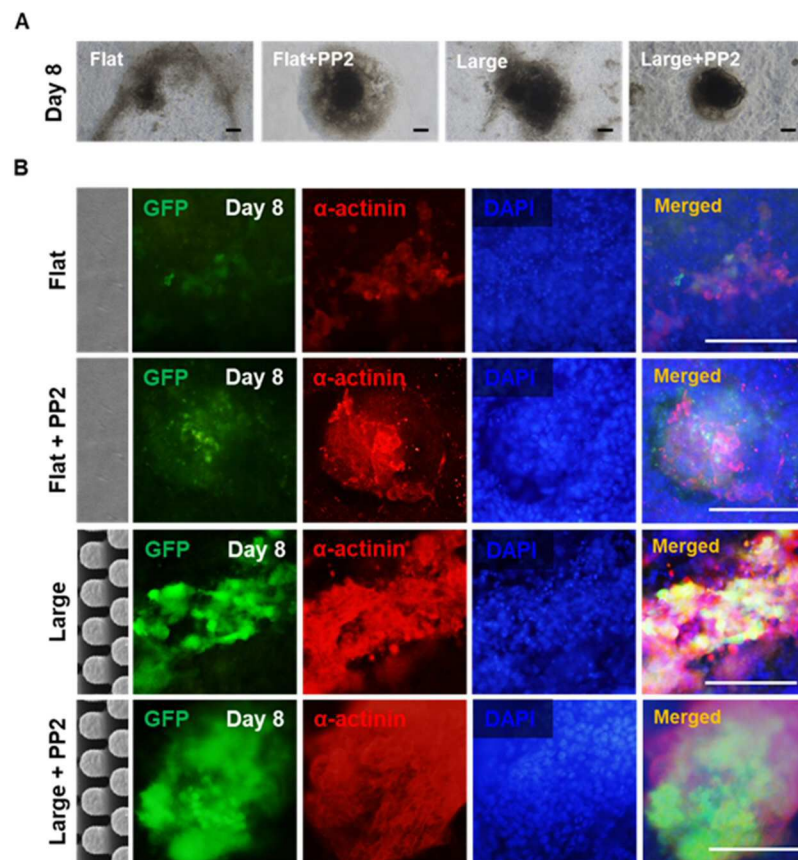
도면12



도면13



도면14



도면15

