(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0104936
(43) 공개일자 2022년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/077* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 5/0658 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0007371
(22) 출원일자 2021년01월19일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35, 103동 603호
최진하
서울특별시 성북구 오패산로16가길 40, 115동 801호
하태형
경기도 광명시 금오로 813-26
(74) 대리인
윤대웅

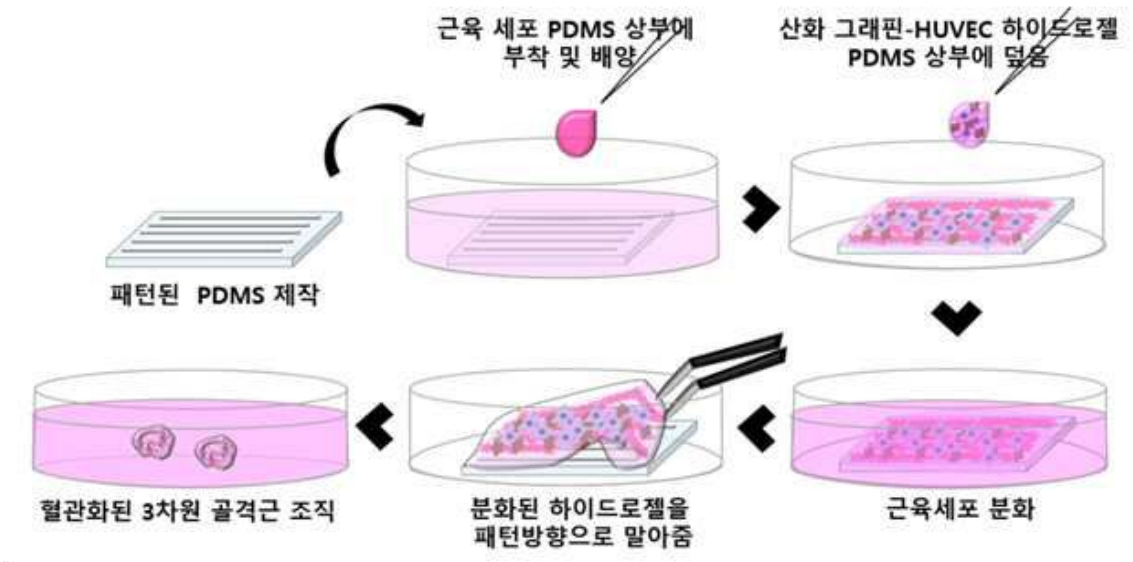
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **혈관화 근육 번들, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 혈관화 근육 번들, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상기 혈관화 근육 번들은 혈관 네트워크 형성으로 인한 근육세포의 근섬유 분화와 산화그래핀을 이용한 전기전도도 향상을 통해 움직임이 강화되므로, 이를 효과적으로 골격근 질환과 관련된 약물 스크리닝 및 생물학적 연구를 위한 플랫폼에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도2a



(52) CPC특허분류
C12N 5/0691 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2533/52 (2013.01)
C12N 2533/54 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711108724
과제번호 2019R1A2C3002300
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 뇌어셈블로이드 기반 생명체 모방 센싱 기능 바이오하이브리드 로봇
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312114
과제번호 2016R1A6A1A03012845
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

근육세포 및 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 제조된 혈관화 근육 번들.

청구항 2

제1항에 있어서, 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관화 근육 번들.

청구항 3

제1항에 있어서, 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관화 근육 번들.

청구항 4

제1항에 있어서, 하이드로젤은 탄소재료를 추가적으로 포함하는 것인, 혈관화 근육 번들.

청구항 5

제4항에 있어서, 탄소재료는 산화 그래핀(Graphene oxide; GO), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그라파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관화 근육 번들.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 혈관화 근육 번들의 제조방법:

선형 패턴화된 기판 위에 근육세포를 부착시키는 부착 단계;

기판 위에 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하는 분화 단계; 및

근육세포 및 하이드로젤을 기판에서 분리하여 배양하는 근육 번들 형성 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관화 근육 번들의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관화 근육 번들의 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 하이드로젤은 탄소재료를 추가적으로 포함하는 것인, 혈관화 근육 번들의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 탄소재료는 산화 그래핀(Graphene oxide; GO), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그라파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 혈관화 근육 번들의 제조방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 근육 번들 형성 단계는 근육세포 및 하이드로젤을 말아서 배양하는 것인, 혈관화 근육 번들의 제조방법.

청구항 12

다음의 단계를 포함하는 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법:

선형 패턴화된 기판 위에 근육세포를 부착시키는 부착 단계;

기판 위에 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하는 분화 단계;

근육세포 및 하이드로젤을 기판에서 분리하여 배양하는 근육 번들 형성 단계;

근육 번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및

후보 물질을 접촉시킨 근육 번들에서의 전기자극에 의한 움직임 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육 번들과 비교하는 약물 평가 단계.

청구항 13

제12항에 있어서, 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약물 스크리닝 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 하이드로젤은 탄소재료를 추가적으로 포함하는 것인, 약물 스크리닝 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 탄소재료는 산화 그래핀(Graphene oxide; GO), 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그라파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약물 스크리닝 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 근육 번들 형성 단계는 근육세포 및 하이드로젤을 말아서 배양하는 것인, 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈관화 근육 번들, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 산화 그래핀(Graphene oxide; GO)이 매립된 하이드로젤, 인간 탯줄유래 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) 및 골격근세포를 이용하여 3차원으로 말린 형태의 근육 번들을 제작하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체에서 가장 풍부한 조직으로 알려진 골격근은 근섬유의 3차원 조직이 세포외기질과 결합하여 복잡한 네트워크 구조를 가지고 있다. 인간의 골격근 조직과 유사한 모델을 개발하기 위해서는 조직 내에 잘 정렬된 근관을 갖춘 이방성 구조가 필수적이다. 이러한 골격근 조직 내에서 이방성 환경은 근육조직 내부 세포의 정렬을 촉진하고 근 신생 및 성숙을 촉진시킨다.

[0003] 최근에는 나노 섬유, 고정재 및 하이드로젤 압축, 화학적 표면 패턴, 기계적 자극, 전기장 또는 자기장이 인간과 유사한 골격근 배양을 위한 이방성 환경을 생성하는데 사용되고 있다. 이러한 인간 골격근 3차원 체외 모델의 개발은 기본적인 생물학적 연구와 재생 의학 전략 개발, 근육 질환에 대한 약물 스크리닝을 위한 중요한 도구를 제공할 수 있다.

[0004] 기존의 3차원 골격근 조직이 가지고 있는 한계점을 극복하기 위하여 보다 복잡한 구조로 인간 근육과 유사한 기능을 하는 3차원 골격근 조직을 만드는 연구가 진행되고 있다. 구체적으로, 인간의 골격근 조직은 단방향으로 배열된 수많은 근관과 고르게 분포된 혈관을 포함하는 복잡한 구조로 구성된다. 이러한 인간과 유사한 골격근 조직을 만들기 위해 인간 탯줄유래 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)를 도입하는 연구가 진행되고 있다.

[0005] HUVEC은 3차원 근육조직과 같은 두꺼운 조직을 제작할 때 충분한 산소와 영양소를 공급하는 역할을 수행한다. 또한 HUVEC과 근육세포는 공동 배양 시에 서로 상호작용하여 근육 생성 또는 혈관화를 유도하는 인자가 풍부하게 발현된다. 따라서, HUVEC 및 근육세포의 공동배양을 통해 혈관계가 형성된 인체와 유사한 골격근 조직을 제작할 수 있으며, 향후 골격근 조직의 세포 생존력을 높이고 치수 한계를 극복하는데 사용될 수 있다.

[0006] 전기 활성 조직에 사용되는 전도성 하이드로젤은 기본 근육과 유사한 전도성으로 인해 골격근 조직 형성을 촉진하고 전기 신호를 전달하는 능력을 가능하게 한다. 산화 그래핀은 고유한 구조와 강력한 C-C 결합으로 인해 우수한 전도성, 큰 종횡비, 우수한 기계적 특성을 가지고 있다. 또한 산화 그래핀은 산화된 표면에 기능기가 존재하여 하이드로젤 내에서 안정된 분산이 가능하여 쉽게 3차원 조직을 개발하는데 사용될 수 있다. 이러한 산화 그래핀 기반 하이드로젤은 산화 그래핀을 도입함으로 인해 하이드로젤 내의 전도성이 증가하여, 전기자극으로 인한 근육의 움직임이 증가될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 생체 내 조건과 유사한 방향성 있는 골격근을 모방하기 위하여, 마이크로 크기의 선 패턴을 가지고 있는 PDMS(polydimethylsiloxane) 위에 마우스 유래 근원세포인 C2C12를 배양하였다. C2C12의 전도도를 향상시키기 위해 산화 그래핀(Graphene oxide; GO)이 매립된 하이드로젤을 이용하여 3차원으로 말린 근육 번들을 제작하였다. 매립된 산화 그래핀은 전기전도도 향상을 통해 근육세포 내의 전기 신호 전달이 용이하며, 근육 조직 형성을 촉진하는 효과를 통해 근육 번들의 움직임을 향상시켰다. 또한, 혈관세포 중 하나인 인간 탯줄유래 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)를 하이드로젤에 섞어서 근육 번들 내로 충분한 산소와 영양분을 공급하고 성장과 성숙을 촉진시키는 역할을 수행할 수 있었다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 근육세포 및 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 제조된 혈관화 근육 번들을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 혈관화 근육 번들의 제조방법을 제공하는 것이다:

[0010] 선형 패턴화된 기판 위에 근육세포를 부착시키는 부착 단계;

[0011] 기판 위에 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하는 분화 단계; 및

[0012] 근육세포 및 하이드로젤을 기판에서 분리하여 배양하는 근육 번들 형성 단계.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:

[0014] 선형 패턴화된 기판 위에 근육세포를 부착시키는 부착 단계;

[0015] 기판 위에 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하는 분화 단계;

[0016] 근육세포 및 하이드로젤을 기판에서 분리하여 배양하는 근육 번들 형성 단계;

[0017] 근육 번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및

[0018] 후보 물질을 접촉시킨 근육 번들에서의 전기자극에 의한 움직임 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육 번들과 비교하는 약물 평가 단계.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 혈관화 근육 번들의 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명은 혈관화 근육 번들, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 산화 그래핀(Graphene oxide; GO)이 매립된 말린 형태의 혈관화 근육 번들은 혈관 네트워크 형성으로 인한 근육세포의 근섬유 분화와 산화그래핀을 이용한 전기전도도 향상을 통해 움직임이 강화되었다.

[0021] 본 발명자들은 인간과 유사한 골격근 조직을 모방하기 위해 산화 그래핀과 인간 탯줄유래 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)가 섞인 하이드로젤을 패턴화된 방향으로 정렬된 근육세포 위에 올리고, PDMS(polydimethylsiloxane) 표면에서 시트 구조의 근육세포-하이드로젤을 분리하였다. 움직임을 더 강화시키기 위하여 3차원으로 말린 형태를 조성함으로써 골격근 조직으로서의 혈관화 근육 번들을 제작하였으며, 근육

번들의 제조에 사용된 하이드로젤 안에 산화 그래핀과 HUVEC를 섞어서 근육세포의 분화 효율을 향상시키고 하이드로젤의 전도성을 증가시켰다. 결과적으로, 골격근 조직의 성장과 분화를 촉진하고 향상된 전도성으로 인해 움직임이 강화된 근육 번들의 제작에 성공하였다.

[0022] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0023] 본 발명의 일 양태는 근육세포 및 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하여 제조된 혈관화 근육 번들이다.

[0024] 본 발명에 있어서 근육세포는 근원세포(myoblast), 근세포(myocyte) 및 근관세포(myotube)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 인간 탯줄유래 혈관내피세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서 하이드로젤은 탄소재료를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 상기 탄소재료는 산화 그래핀, 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그라파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 산화 그래핀인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 다른 양태는 다음의 단계를 포함하는 혈관화 근육 번들의 제조방법이다:

[0029] 선형 패턴화된 기판 위에 근육세포를 부착시키는 부착 단계;

[0030] 기판 위에 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하는 분화 단계; 및

[0031] 근육세포 및 하이드로젤을 기판에서 분리하여 배양하는 근육 번들 형성 단계.

[0032] 본 발명에 있어서 근육세포는 근원세포, 근세포 및 근관세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 인간 탯줄유래 혈관내피세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서 하이드로젤은 탄소재료를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0035] 상기 탄소재료는 산화 그래핀, 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그라파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 산화 그래핀인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서 분화 단계는 1 내지 5일, 1 내지 4일, 1 내지 3일, 2 내지 5일, 또는 2 내지 4일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 2 내지 3일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에 있어서 근육 번들 형성 단계는 근육세포 및 하이드로젤을 말아서 배양하는 것일 수 있다. 말아주는 방향은 기판의 패턴화 방향일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 근육 번들 형성 단계는 10 내지 25일, 10 내지 20일, 10 내지 15일, 12 내지 25일, 또는 12 내지 20일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 12 내지 15일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 분화 단계 후 기판 위의 하이드로젤을 가장자리부터 일정한 방향으로 말아주면 기판에 부착되었던 근육세포와 함께 말린 형태로 성형할 수 있다. 이에 대하여 근육 번들 형성 단계를 수행하면 혈관화 근육 번들을 제조할 수 있다.

[0040] 본 발명의 다른 양태는 다음의 단계를 포함하는 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법이다:

[0041] 선형 패턴화된 기판 위에 근육세포를 부착시키는 부착 단계;

[0042] 기판 위에 혈관세포를 포함하는 하이드로젤을 배양하는 분화 단계;

[0043] 근육세포 및 하이드로젤을 기판에서 분리하여 배양하는 근육 번들 형성 단계;

[0044] 근육 번들에 후보 물질을 접촉시키는 약물 접촉 단계; 및

[0045] 후보 물질을 접촉시킨 근육 번들에서의 전기자극에 의한 움직임 정도를 후보 물질을 접촉시키지 않은 근육 번들

과 비교하는 약물 평가 단계.

[0046] 본 발명에 있어서 근육세포는 근원세포, 근세포 및 근관세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서 혈관세포는 혈관내피세포, 혈관내피전구세포 및 혈관평활근세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 인간 탯줄유래 혈관내피세포인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 있어서 하이드로젤은 탄소재료를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0049] 상기 탄소재료는 산화 그래핀, 탄소나노튜브, 탄소나노섬유 및 그라파이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 산화 그래핀인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 있어서 분화 단계는 1 내지 5일, 1 내지 4일, 1 내지 3일, 2 내지 5일, 또는 2 내지 4일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 2 내지 3일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에 있어서 근육 번들 형성 단계는 근육세포 및 하이드로젤을 말아서 배양하는 것일 수 있다. 말아주는 방향은 기판의 패턴화 방향일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 근육 번들 형성 단계는 10 내지 25일, 10 내지 20일, 10 내지 15일, 12 내지 25일, 또는 12 내지 20일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 12 내지 15일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에 있어서 골격근 질환은 골격근 피로, 운동 유발 골격근 피로, 근육 이영양증, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질 (cachexia) 또는 노인성근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0054] 본 발명은 혈관화 근육 번들, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 골격근 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상기 혈관화 근육 번들은 혈관 네트워크 형성으로 인한 근육세포의 근섬유 분화와 산화그래핀을 이용한 전기전도도 향상을 통해 움직임이 강화되므로, 이를 효과적으로 골격근 질환과 관련된 약물 스크리닝 및 생물학적 연구를 위한 플랫폼에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 패턴화된 PDMS(polydimethylsiloxane) 기판을 광학현미경으로 확인한 사진이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 기판의 패턴화 방향에 따라 분화된 근육세포를 광학현미경으로 확인한 사진이다.

도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따른 패턴화된 PDMS 기판 상에서 정렬되어 분화된 근육세포를 면역염색법으로 확인한 사진이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화 그래핀(Graphene oxide; GO) 및 인간 탯줄유래 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)가 포함된 하이드로젤을 이용한 근육 번들 제작 모식도이다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 기판에 부착된 근육세포 위에 산화 그래핀 및 HUVEC가 포함된 하이드로젤을 올린 상태의 광학이미지 사진이다.

도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화 그래핀 및 HUVEC가 포함된 하이드로젤을 3차원으로 말아 분화시킨 근육 번들의 광학이미지 사진이다.

도 2d는 본 발명의 일 실시예에 따른 C2C12만으로 제조된 근육 번들, C2C12에 HUVEC이 적용된 근육 번들, 및 C2C12에 HUVEC 및 산화 그래핀이 적용된 근육 번들로 제작된 골격근 조직의 광학이미지이다.

도 2e는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화 그래핀 및 HUVEC가 포함된 하이드로젤을 이용한 근육 번들에 대하여 면역염색법을 이용하여 근섬유를 확인한 형광 이미지이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 조건별 근육 번들의 시간별 움직임 거리를 비교한 그래프이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 조건별 근육 번들의 시간 경과에 따라 누적된 움직임 거리를 비교한 그래프이다.

도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 조건별 근육 번들의 움직임 속도를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0057] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0059] **실시예 1: 패턴화된 PDMS 기판 제작 및 패턴화된 근육세포 확인**

[0060] 3차원 근육 조직을 제작함에 있어서, 이에 사용되는 근육세포를 보다 더 성숙한 근관으로 분화시키기 위하여 패턴화된 PDMS(polydimethylsiloxane)를 제작하였다. 먼저, PDMS(SYLGARD 184)를 패턴화된 실리콘 웨이퍼에 부은 후, 기포를 제거하고 70℃ 오븐에서 1시간 동안 경화하였다. 그런 다음 PDMS를 웨이퍼에서 제거하고 스탬프로 사용할 부분을 자른 뒤, 에탄올과 증류수로 세척하고 O_2 플라즈마 처리를 통해 PDMS 스탬프 표면을 친수성 성질로 만들었다. 피브로넥틴(Fibronectin)을 PDMS 스탬프 표면에 코팅한 뒤, 4℃에서 하루동안 보관하고 세척하였다.

[0061] 웨이퍼에서 제거한 PDMS 중 기판으로 사용할 부분을 근육세포를 배양하고자 하는 면적에 해당하는 적당한 크기로 자른 후, PDMS 기판 표면을 O_2 플라즈마 처리를 통해 친수성 성질로 만들었다. 이후 피브로넥틴 코팅된 PDMS 스탬프를 이용하여 PDMS 기판에 패턴을 만들었다. 도 1a와 같이 광학 현미경을 통해 패턴화된 기판을 확인하였다.

[0062] 세포 배양 접시안에 놓인 패턴화된 PDMS 기판 상부에 마우스 유래 근원세포(myoblast)인 C2C12를 올려준 뒤, 근육세포 성장 배양액(DMEM, 10% fetal bovine serum, 1% p/s (penicillin/streptomycin))을 넣어주었다.

[0063] 도 1b에서 확인할 수 있듯이, C2C12는 대략 2일 안에 패턴화된 PDMS 기판 위에서 일자방향으로 방향성을 가지며 증식되었다.

[0064] 또한 도 1c에서 확인할 수 있듯이, 근육세포 분화 배양액을 넣어준 후 PDMS 표면에 분화된 C2C12를 근육 분화 마커인 α-actinin을 이용하여 면역염색을 실시한 결과, 근육세포가 패턴화된 방향으로 잘 정렬되어 분화될 수 있음을 확인하였다.

[0066] **실시예 2: 전도성 하이드로젤을 이용한 3차원 혈관화 근육 번들 제작**

[0067] 도 2a와 같이 3차원 혈관화 근육 번들을 제작하였다.

[0068] 구체적으로, 산화 그래핀-HUVEC 하이드로젤은 340 μL 인간 탯줄유래 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC), 300 μL 마트리겔(Matrigel), 250 μL 16 mg/ml 피브로넥틴, 10 μL 트롬빈(thrombin(0.5 U/1 mg Fibronogen)), 100 μL 산화 그래핀(Graphene oxide; GO)의 혼합물을 이용해 제조하였다.

[0069] 미리 C2C12가 부착된 PDMS 기판 상부에 도 2b와 같이 70 μL 산화 그래핀-HUVEC 하이드로젤을 상부에 뿌려주고, 근육세포 성장 배양액(DMEM, 10% fetal bovine serum, 1% p/s, 1 mg/mL ACA(aminocaproic acid))을 넣어주었다. 2일 동안 배양한 후, 끝이 둥근 핀셋으로 PDMS 상부에 C2C12가 부착된 산화 그래핀-HUVEC 하이드로젤을 패턴화된 방향으로 말아주고, 근육세포 분화 배양액(DMEM 2% horse serum, 1% p/s, 1 mg/mL ACA 및 50 ng/mL IGF-1(insulin-like growth factor))을 넣어주었다. 2일에 한번씩 배양액을 교체하고, 14일 이상 분화를 진행하였다. 제작한 3차원 혈관화 근육 번들을 확인하고자 광학 이미지를 얻어 그 모양을 확인하였다.

[0070] 도 2c에서 확인할 수 있듯이, 3차원 혈관화 근육 번들이 성공적으로 제작되었다.

[0071] 산화 그래핀-HUVEC 하이드로젤의 영향을 확인하고자 C2C12만 존재하거나 C2C12와 HUVEC만 있는 하이드로젤을 대조군으로 설정하여 같은 방법으로 도 2d와 같은 근육 번들을 제작하였다. 또한, 제작한 3차원 근육 조직 내의 근육세포 분화와 혈관 형성을 확인하고자 근육 분화 마커인 α-액티닌(α-actinin)과 혈관 내피세포 마커인 CD31를 이용하여 면역염색을 실시하였다.

[0072] 도 2e에서 확인할 수 있듯이, 골격근 조직 내 근섬유가 확연하게 발생하였다. 또한 패턴화된 방향으로 근섬유와 혈관이 잘 정렬되어 형성되었고, 산화 그래핀-HUVEC 하이드로젤로 제작한 3차원 혈관화 근육 번들이 대조군 대비 성숙한 근섬유를 더 많이 가지고 있음을 확인하였다.

[0074] **실시예 3: 제작된 골격근 조직의 움직임 확인**

[0075] 본 연구에서 제시한 전도성 하이드로젤을 이용하여 혈관화된 3차원 근육 번들은 실시예 2의 3차원 혈관화 근육 번들 제조 과정에 따라 근섬유로의 성숙에 필요한 14일 이상의 분화를 수행한 후 현미경을 사용하여 움직임을 확인하였다.

[0076] 근육세포만 있는 근육 번들, 근육세포와 HUVEC가 포함된 근육 번들, 및 근육세포와 HUVEC 및 산화 그래핀이 포함된 근육 번들에 10 V, 1 Hz의 전기자극을 가해서 움직임을 유도하였다. 측정된 움직임 데이터에 근거하여 산화 그래핀과 HUVEC 유무에 따른 근육 조직의 움직임을 수치화(Fuji, Image J)하여 비교하였다.

표 1

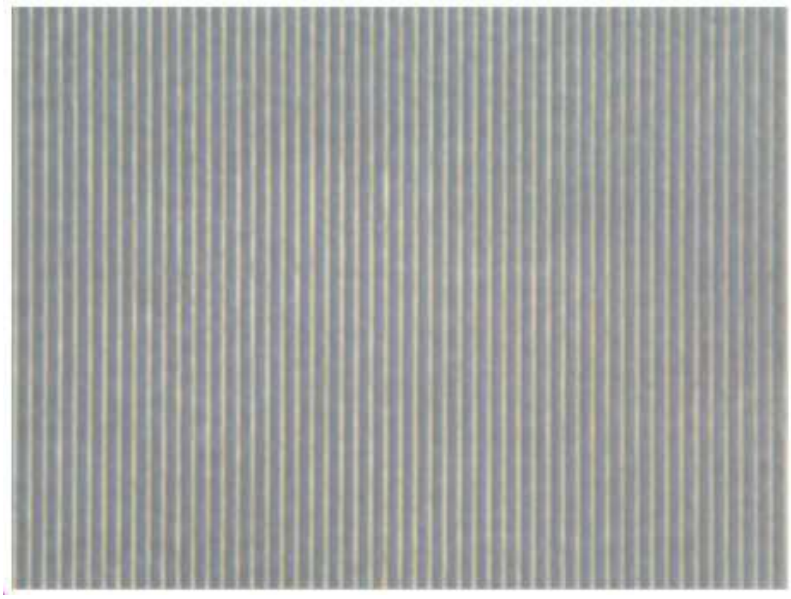
[0077]

HUVEC	-	+	+
GO	-	-	+
속도(um/sec)	8.71	22.00	30.70

[0078] 표 1, 도 3a 내지 3c에서 확인할 수 있듯이, 20초 동안 움직임을 비교하였을 때, 산화 그래핀 또는 HUVEC이 포함된 하이드로젤을 사용한 근육 번들의 움직임이 산화 그래핀과 HUVEC이 포함되지 않은 하이드로젤을 사용한 근육 번들의 움직임에 비해 최소 2배에서 최대 3배 이상 강화되어 결과적으로 움직임의 속도 또한 증가한 것을 확인하였다.

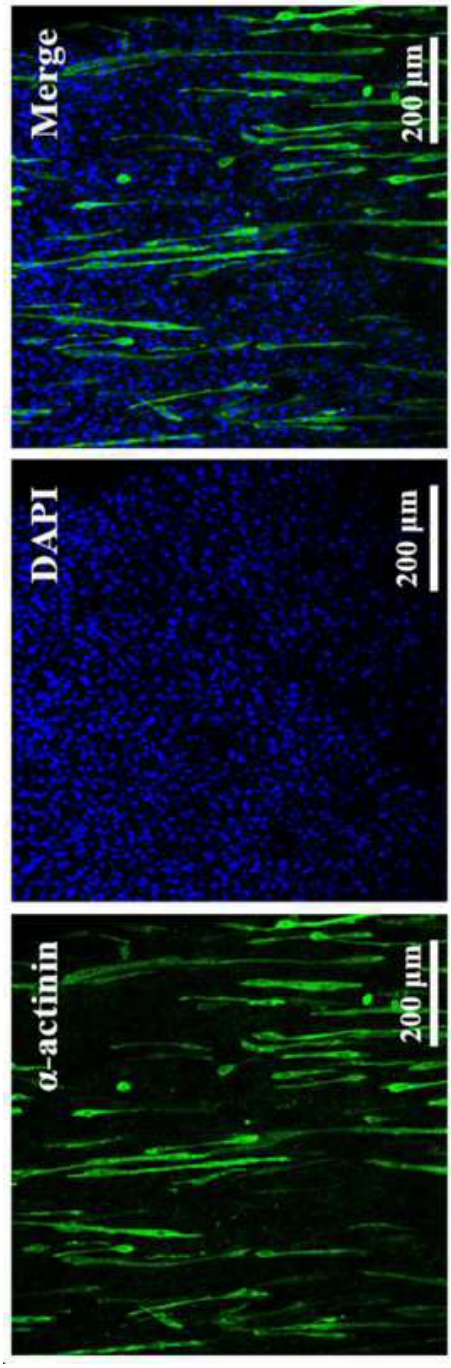
도면

도면1a

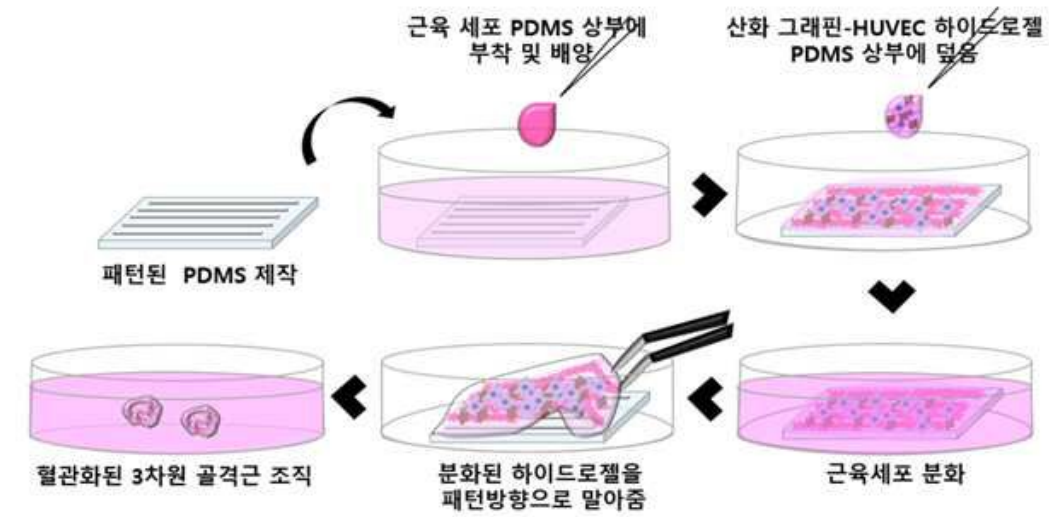


도면1b

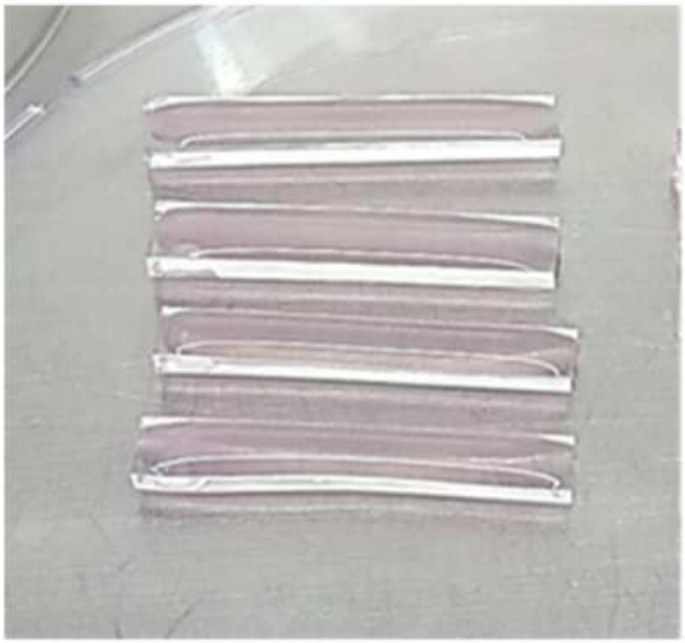
도면1c



도면2a


근육 세포 PDMS 상부에
부착 및 배양
산화 그래핀-HUVEC 하이드로젤
PDMS 상부에 덮음
패턴된 PDMS 제작
혈관화된 3차원 골격근 조직
분화된 하이드로젤을
패턴방향으로 말아줌
근육세포 분화

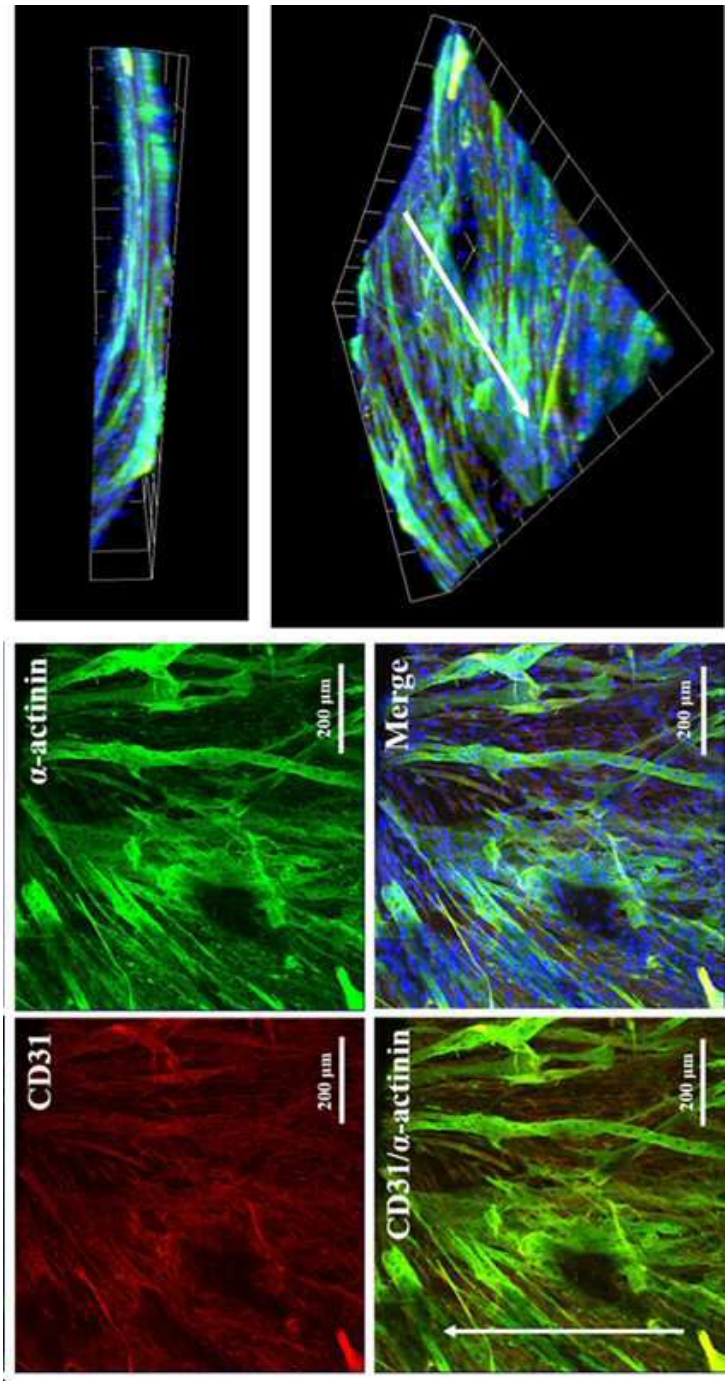
도면2b



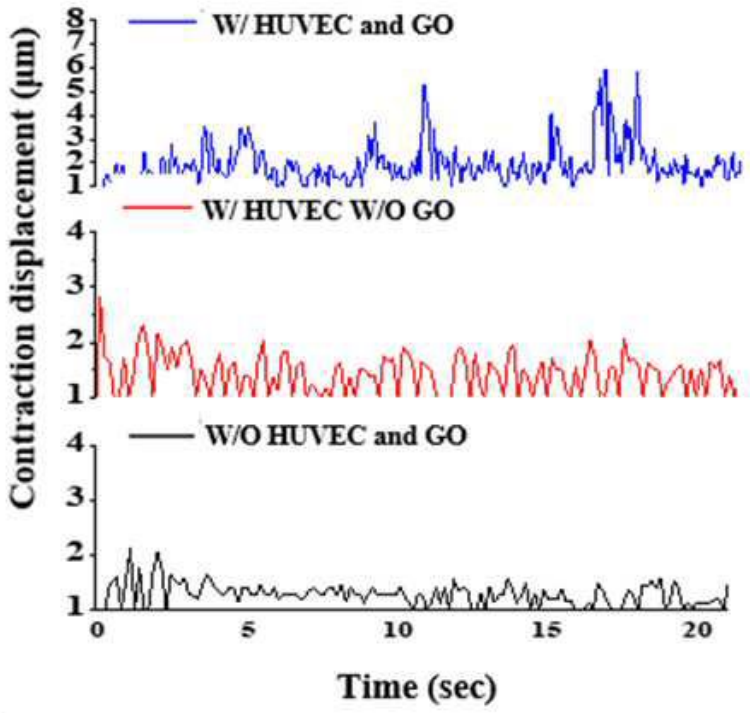
도면2c

도면2d

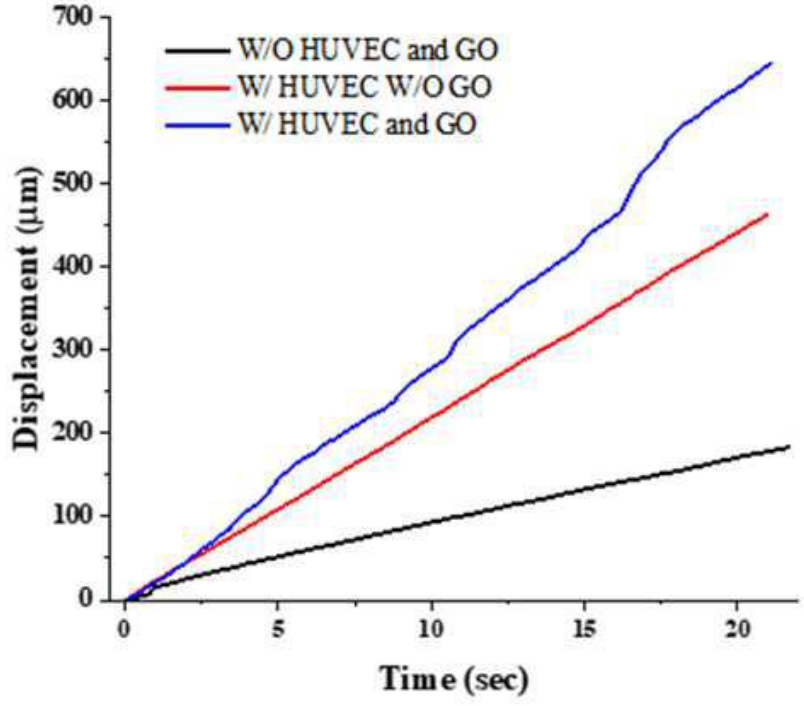
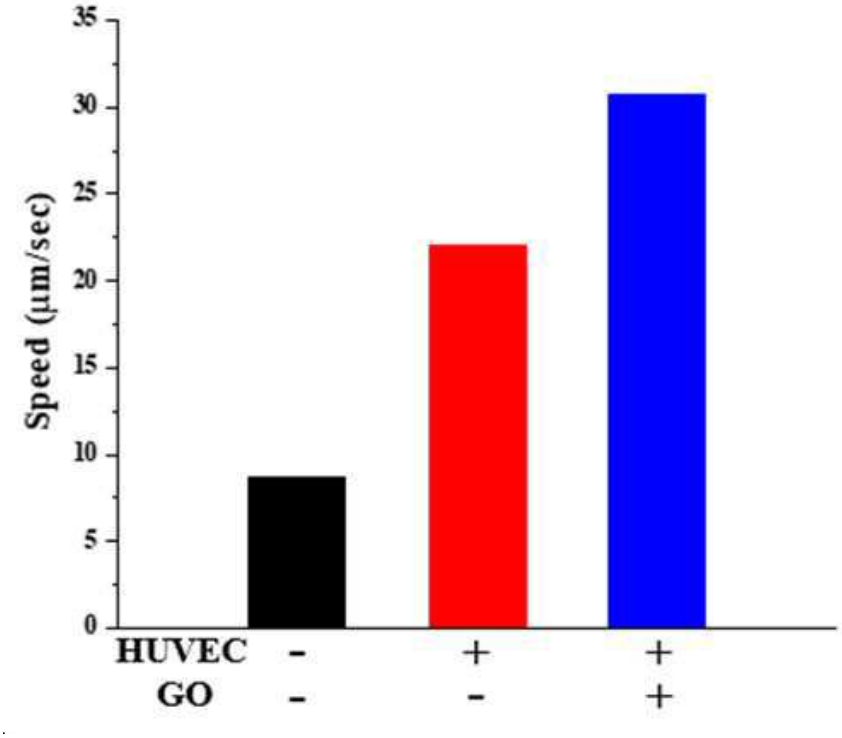
도면2e



도면3a


W/ HUVEC and GO
W/ HUVEC W/O GO
W/O HUVEC and GO
Contraction displacement (μm)
Time (sec)

도면3b


W/O HUVEC and GO
W/ HUVEC W/O GO
W/ HUVEC and GO
Displacement (μm)
Time (sec)

도면3c