



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0121073
(43) 공개일자 2022년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/46 (2006.01) A61L 27/50 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0025047

(22) 출원일자 2021년02월24일

심사청구일자 2021년02월24일

(71) 출원인

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

주식회사 티엠에스헬스케어

충청북도 청주시 청원구 오창읍 연구단지 40, 305호, 306호 (충북테크노파크스타기업관)

(72) 발명자

김근형

경기도 성남시 분당구 구미로 186번길 19, B동 202호(구미동, 동서프라임빌)

황보한준

서울특별시 성북구 돈암동 성북로 4길 52, 201동 1303호

김원진

서울특별시 노원구 석계로13길 35, 1106호

(74) 대리인

이명진

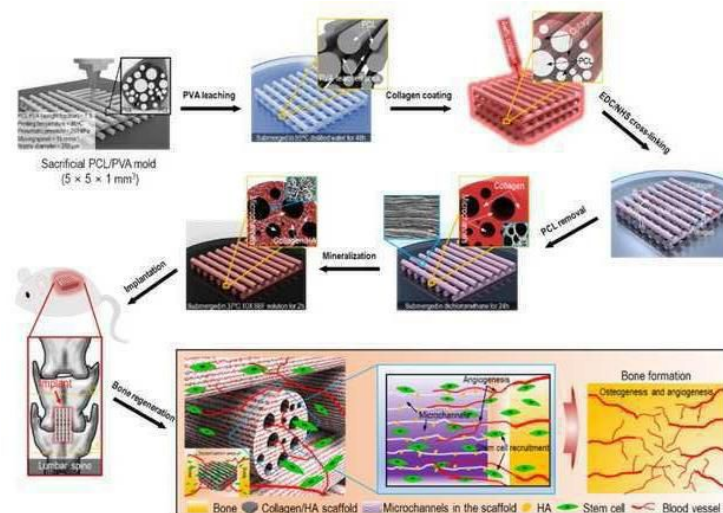
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조 및 구현

(57) 요약

본 발명은 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 스캐폴드 등에 관한 것으로, 본 발명의 방법으로 제작된 콜라겐/하이드록시아파타이트(HA) 스캐폴드는 마이크로채널 구조의 높은 모세관 압력(capillary pressure)을 갖고, 코팅된 HA로 인해 생체 외 및 생체 내에서 줄기세포 및 영양소를 효과적으로 흡수할 수 있으며, 신생 혈관 생성 및 골 조직재생을 가속화시킬 수 있으므로, 다양한 조직공학 및 의료기술에 응용되어 뼈 이식 대체물, 척추유합술 등에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61L 27/3895 (2013.01)

A61L 27/46 (2013.01)

A61L 27/507 (2013.01)

C12M 21/08 (2013.01)

C12M 25/14 (2013.01)

A61L 2400/08 (2013.01)

A61L 2430/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711115240
과제번호	2018R1A2B2005263
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구(총연구비3억초과~5억이하)
연구과제명	세포프린팅/동결보존기술 개발을 기반으로 한 동물대체시험용 gut/skin-on-a-chip

제작

기 여 율	50/100
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105883
과제번호	2018M3C1B7021997
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	자연모사혁신기술개발사업
연구과제명	생물학적 활성과 계층적 구조를 지닌 자연모사 인공 골 조직 공정 기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2018.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 폴리비닐알코올(Poly(vinyl alcohol): PVA) 및 생체적합성 고분자를 포함하는 잉크를 압출하여 구조체를 제조하는 단계;
- (b) 상기 구조체를 침지하여 PVA를 침출하는 단계;
- (c) 상기 PVA가 침출된 구조체를 콜라겐으로 코팅하는 단계;
- (d) 상기 콜라겐 코팅된 구조체를 유기용매에 담지하여 생체적합성 고분자를 제거하는 단계; 및
- (e) 상기 생체적합성 고분자가 제거된 구조체를 하이드록시아파타이트(HA)로 코팅하는 단계;를 포함하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 잉크는 PVA 및 생체적합성 고분자가 3 : 1 내지 20의 중량비율로 포함된 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 생체적합성 고분자는 합성 고분자 또는 천연 고분자인 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 합성 고분자는 폴리-ε-카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리-락틱-코-글리콜릭산(Poly(lactic-co-glycolic acid): PLGA), 및 폴리락틱산(Polylactic acid: PLLA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 천연 고분자는 콜라겐(collagen), 키토산(chitosan), 알지네이트(alginate), 및 젤라틴(gelatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계의 침지는 10 내지 80 ℃의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의

제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계의 침지는 물, 인산완충액 (PBS; phosphate buffered-saline), 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계의 콜라겐 코팅은 0.5 내지 10 중량%의 콜라겐으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (d) 단계의 유기용매는 아세톤(Acetone, AC), 클로로폼(chloroform, CF), 디메틸설폭시드(DMSO), N-메틸-2-피롤리돈(NMP), 디메틸포름아마이드(Dimethylformamide, DMF), 다이클로로에테인(Dichloroethene; DCE), 및 디클로로메탄(Dichloromethane; DCM)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 (e) 단계의 HA 코팅은 의사체액을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드는 세포 증식 또는 분화 효과가 있는 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법.

청구항 12

콜라겐 및 하이드록시아파타이트(HA)를 포함하는 마이크로채널화된 스캐폴드로서,

상기 스캐폴드는 제1항의 방법으로 제조된 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 스캐폴드는 다공성인 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 스캐폴드는 줄기세포(stem cell), 골아세포 (osteoblast), 조연골세포 (chondroblast), 근원세포 (myoblast), 건세포(tenocyte), 심근원세포 (cardiomyoblast), 평활근세포 (smooth muscle cell), 신경세포 (neural cell), 및 혈관세포 (vascular cells)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포를 증식 또는 분화시키는 용도인 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 스캐폴드는 골 재생용 또는 혈관 신생 유도용 스캐폴드인 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 스캐폴드 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 조직공학은 생명과학과 공학의 원리를 활용하여 조직의 기능을 재생, 유지, 혹은 향상시키는 생물학적 제품을 개발하려는 여러 학문이 제휴한 분야이다. 대표적인 방법으로는 재생을 원하는 조직으로부터 세포를 분리하여 배양하고 이를 적절한 생체재료에 접목하여 증폭 배양함으로써 인공적으로 조직을 형성하는 기술이다.

[0004] 이러한 기술에는 세포를 필요한 부위에 전달하기 쉽고, 조직이 성장하는데 3차원 구조로 기계적인 보조역할을 할 수 있으며 기능을 할 수 있는 새로운 조직으로 만들어 나가는 적당한 세포지지체, 즉 스캐폴드가 필요하다. 이러한 스캐폴드는 세포가 증식하고 특유의 기질을 만들 수 있는 적절한 미세구조를 갖고 있어야 하며, 3차원으로 상호 연결된 많은 기공을 가지고 있어 세포가 이 기공을 통해 안으로 자랄 수 있어야 하고, 세포 성장에 필요한 영양분을 공급할 수 있어야 한다.

[0005] 인공 조직의 성능 향상을 위해 최근의 인공 조직은 성장인자와 세포를 원하는 위치에 보유할 수 있고 세포를 균일하게 분포시킬 수 있으며, 성장인자를 효과적으로 운반할 수 있다는 점으로 인해 세포 프린팅 기술(cell printing techniques)이 다양한 조직 재생 분야에 널리 응용되고 있다. 성공적인 조직 재생을 위해서 세포가 탑재되는 담체는 높은 다공성과 공극 크기 조절 가능성, 산소와 영양성분 공급 등을 위해 공극 간 100% 상호연결성을 갖추어야 한다.

[0006] 한편, 오늘날 고령화 사회로의 진입과 골질환 환자의 증가로 인하여 골대체 및 골재생을 위한 연구가 많이 이루어지고 있다. 특히 손상된 생체조직을 대체하는 방법으로 티타늄 등의 금속과 세라믹 등 비흡수성 생체재료를 이용하여 치아나 대퇴골을 직접 대체하는 임플란트 기술은 이미 임상에서 광범위하게 사용되고 있다.

[0007] 생체조직은 다종의 세포와 세포의 물질과의 상호작용에 의해 그 형태와 기능이 유지되고 다양한 생명현상이 조절된다. 세포의 물질 중에는 단백질과 다당류와 같은 유기 고분자를 주성분으로 하고 있는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)이라고 불리는 유기 고형물질이 생체조직 내에서 가교된 겔 상태 또는 다공성 네트워크로 존재한다. 이는 조직의 구조적 지지체로서 그리고 세포의 접착유도물질 역할을 한다. 세포가 ECM에 접촉하면 세포내 정보 전달이 활성화되고, 세포 형태, 분화, 증식, 세포사(cell death) 등의 기본적인 세포기능이 제어된다.

[0008] 일반적으로 다공성 스캐폴드는 대개 고분자 스펀지에 인산칼슘 슬러리를 코팅하고 건조공정 및 열처리공정을 거

침으로써 고분자 스폰지를 열분해 시키는 스폰지 복제법(sponge replication)을 이용하여 제조할 수 있는데, 이 경우 열분해 및 분쇄 시 기공이 서로 연결된 개기공이 으스러지거나 없어지는 단점이 있다. 그 밖에도 전구체에 기체 또는 기체를 발생시키는 발포체를 혼합하여 응고시킨 후, 건조공정 및 소결공정을 거침으로써 기공을 형성 시키는 화학적 발포법을 이용하여 제조할 수 있는데, 이 경우 금속 촉매가 독성을 나타내므로 바람직하지 않다.

[0009] 한편, 스캐폴드로 가장 일반적으로 이용하는 세라믹 재료 중 인산칼슘계는 골조직과 치아의 성분 및 구조와 유사하며, 생체친화성을 가지고 있기 때문에 골이식 재료로써 많은 연구가 이루어져 왔다. 인산칼슘계 세라믹스 중 수산화인회석(hydroxyapatite)과 삼인산 칼슘(tricalcium phosphate) 혹은 이 두 상을 혼합한 이상인산칼슘(biphasic calcium phosphate)은 우수한 생체친화성과 골전도성, 그리고 생분해성을 가지고 있어 현재까지 광범위하게 연구되고 있다.

[0010] 이 중에서 가장 안정적인 하이드록시아파타이트(HA) 상과 용해도가 높은 β -TCP상이 혼합된 BCP가 치과와 정형외과에서 성공적인 골이식 대체재로 사용되고 있다. 이러한 합성골 이식재들은 생체 내에서의 흡수성이 물리·화학적 성질에 따라 다르며, 이식재의 표면적, 미세형태, 다공성의 정도와 결정화도(crystallinity)에 따라 분해 속도가 다르게 나타난다.

[0011] 일반적으로 결정화도가 유사한 경우와 개개 이식재의 입자 크기가 크면, 흡수와 관련하여 생체 내 잔존기간이 비교적 길고, 치밀한 소결체가 아니면 마모입자(wear debris) 형성 시 대식세포 반응을 유발하므로 인한 골 용해(osteolysis) 발생의 가능성을 전혀 배제할 수 없다.

[0012] 또한, 골이식재 자체에 존재하는 미세기공(macropore)이 골재생에 긍정적인 역할을 하는 것으로 알려졌지만, 골이식재 자체의 미세기공의 크기나 수가 커질수록 골충진재의 강도가 감소할 수 있다는 단점을 가지며, 다공성 구조 외에 골이식재의 조성, 마이크론 단위의 표면형태 등의 특성이 골재생에 영향을 미치는 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려졌다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1712555호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 이에, 본 발명자들은 조직, 특히 골 및 혈관 재생을 위한 스캐폴드에 대한 연구를 거듭한 결과, 다공성 구조를 가지면서 체내 분해도가 낮으면서, 배열된 구조를 갖는 조직의 재생을 위해 배열된 형태의 구조를 가진 스캐폴드 제작을 위한 제조방법을 발명하고, 상기 제조방법을 통한 마이크로채널화된 스캐폴드의 경우 다공성이 우수할 뿐만 아니라, 체내 분해속도가 낮고, 빠른 세포성장 및 세포분화(특히, 골분화) 효과가 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] 이에, 본 발명의 목적은 (a) 폴리비닐알코올(Poly(vinyl alcohol): PVA) 및 생체적합성 고분자를 포함하는 잉크를 압출하여 구조체를 제조하는 단계;

[0017] (b) 상기 구조체를 침지하여 PVA를 침출하는 단계;

[0018] (c) 상기 PVA가 침출된 구조체를 콜라겐으로 코팅하는 단계;

[0019] (d) 상기 콜라겐 코팅된 구조체를 유기용매에 담지하여 생체적합성 고분자를 제거하는 단계; 및

[0020] (e) 상기 생체적합성 고분자가 제거된 구조체를 하이드록시아파타이트(HA)로 코팅하는 단계;를 포함하는,

[0021] 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 다른 목적은 콜라겐 및 하이드록시아파타이트(HA)를 포함하는 마이크로채널화된 스캐폴드로서, 상기 스캐폴드는 상기 방법으로 제조된 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드를 제공하는 것이다.

[0023] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술 분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0025] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 폴리비닐알코올(Poly(vinyl alcohol): PVA) 및 생체적합성 고분자를 포함하는 잉크를 압출하여 구조체를 제조하는 단계;
- [0026] (b) 상기 구조체를 침지하여 PVA를 침출하는 단계;
- [0027] (c) 상기 PVA가 침출된 구조체를 콜라겐으로 코팅하는 단계;
- [0028] (d) 상기 콜라겐 코팅된 구조체를 유기용매에 담지하여 생체적합성 고분자를 제거하는 단계; 및
- [0029] (e) 상기 생체적합성 고분자가 제거된 구조체를 하이드록시아파타이트(HA)로 코팅하는 단계;를 포함하는, 마이크로채널화된 스케폴드의 제조방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 (a) 단계의 잉크는 PVA 및 생체적합성 고분자가 3 : 1 내지 20의 중량비율로 포함된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 생체적합성 고분자는 합성 고분자 또는 천연 고분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 합성 고분자는 폴리-ε-카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리-락틱-코-글리콜릭산(Poly(lactic-co-glycolic acid): PLGA), 및 폴리락틱산(Polylactic acid: PLLA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 천연 고분자는 콜라겐(collagen), 키토산(chitosan), 알지네이트(alginate), 및 젤라틴(gelatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (b) 단계의 침지는 10 내지 80 °C의 조건에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (b) 단계의 침지는 물, 인산완충액(PBS; phosphate buffered-saline), 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (c) 단계의 콜라겐 코팅은 0.5 내지 10 중량%(wt%)의 콜라겐으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (d) 단계의 유기용매는 아세톤(Acetone, AC), 클로로폼(chloroform, CF), 디메틸설폭시드(DMSO), N-메틸-2-피롤리돈(NMP), 디메틸포름아마이드(Dimethylformamide, DMF), 다이클로로에테인(Dichloroethene; DCE), 및 디클로로메탄(Dichloromethane; DCM)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (e) 단계의 HA 코팅은 의사체액을 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 스케폴드는 세포 증식 또는 분화 효과가 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된, 콜라겐 및 하이드록시아파타이트(HA)를 포함하는 마이크로채널화된 스케폴드를 제공한다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 스케폴드는 다공성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 스케폴드는 줄기세포(stem cell), 골아세포(osteoblast), 조연골세포(chondroblast), 근원세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 심근원세포(cardiomyoblast), 평활근세포(smooth muscle cell), 신경세포(neural cell), 및 혈관세포(vascular cells)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포를 증식 또는 분화시키는 용도일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 스캐폴드는 골 재생용 또는 혈관 신생 유도용일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0045] 본 발명자들은 3D 프린팅 기술을 이용하여 PCL 템플릿을 제작하고, 콜라겐 코팅을 통해 미세 마이크로채널 구조를 갖는 콜라겐 스캐폴드를 제작하고, 제작된 콜라겐 스캐폴드를 의사체액에 침지시켜 미세 마이크로채널 안에 HA를 효과적으로 코팅하였다.

[0046] 따라서, 본 발명의 방법으로 제작된 콜라겐/HA 스캐폴드는 마이크로채널 구조의 높은 모세관 압력(capillary pressure)을 갖고, 코팅된 HA로 인해 생체 외 및 생체 내에서 줄기세포 및 영양소를 효과적으로 흡수할 수 있으며, 신생 혈관 생성 및 골 조직재생을 가속화시킬 수 있으므로, 다양한 조직공학 및 의료기술에 응용되어 뼈 이식 대체물, 척추유합술 등에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 마이크로채널화된 콜라겐/하이드록시아파타이트 스캐폴드 제작 및 체내 구현을 설명하는 모식도를 나타낸 것이다.

도 2a는 PCL/PVA 혼합 시스템을 기반으로 한 배열된 PCL 미세섬유 다발 제작 모식도를 나타낸 것이다.

도 2b는 노즐의 테이퍼링 영역에서 혼합된 물질의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 2c는 노즐의 원통형 영역에서 혼합된 물질의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 3a는 코팅 시의 다양한 콜라겐 하이드로겔 중량비에 따른 마이크로채널화된 스캐폴드의 콜라겐 구조의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 3b는 제조된 마이크로채널의 공극 직경을 나타낸 것이다.

도 3c는 제조된 스캐폴드의 3D 표면도 결과를 나타낸 것이다.

도 4a는 제작된 스캐폴드의 구조적 분석을 위한 다양한 각도에서의 평면 개략도를 나타낸 것이다.

도 4b는 10X SBF 처리 시간에 따른 SEM/EDS 매핑 이미지를 나타낸 것이다.

도 4c는 10X SBF 처리 시간에 따른 Ca/P 비율을 나타낸 것이다.

도 4d는 하이드록시아파타이트 형성을 나타내는 XRD 데이터를 나타낸 것이다,

도 5a는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 지형적(topographical) 패턴 및 EDS 매핑을 포함한 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 5b는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 배열성 측정 데이터의 반치전폭(FWHM; full width at half maximum)과 방향계수 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 5c는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 기계적 강도 (compressive strain-stress curve) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 5d는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 SBF 처리 전/후에 따른 압축 강도를 나타낸 것이다.

도 5e는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 다공성을 나타낸 것이다.

도 5f는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 상대 단백질 흡수능 (1, 3, 6, 12시간)을 나타낸 것이다.

도 5g는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 온도에 따른 열중량분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 1일, 3일, 7일 차 스캐폴드의 Live (녹색)/Dead (빨간색) 세포 이미지를 나타낸 것이다.

도 6b는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 Live (녹색)/Dead (빨간색) 세포 이미지를 바탕으로 세포 생존율을 분석한

결과를 나타낸 것이다.

도 6c는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 1일, 3일, 7일 차 MTT 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6d는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 7일차 세포 배양 후 세포핵 (DAPI)과 F-actin (Phalloidin) 염색 결과 및 세포 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 6e는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드에서 인간 지방 유래 줄기세포(hASC) 배양 14일째 알칼리 포스파테이스(ALP) 염색 및 Alizarin Red S(ARS) 염색 이미지를 나타낸 것이다.

도 6f는 LC-스캐폴드, MC-스캐폴드의 14, 21일차 RT-PCR 분석 데이터를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 본 발명자들은 다공성 구조가 요구되는 조직재생을 위한 스캐폴드에 대한 연구를 거듭한 결과, PVA/PCL 함유 잉크를 출력함으로써 배열된 구조를 갖는 PCL 템플릿을 제작하고, PCL 템플릿을 침지시켜 PVA를 제거한 뒤 콜라겐을 코팅 및 가교한 뒤, PCL을 제거하고, 의사체액을 사용하여 HA를 코팅한 마이크로채널화된 스캐폴드를 제작하였다(실시예 1 참조).
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서는, PVA의 분자량에 따라 PCL 템플릿의 배열성이 달라짐을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [0051] 본 발명의 다른 실시예에서는, 콜라겐 하이드로젠 중량비에 따라 스캐폴드의 마이크로채널 구조 및 배열성이 상이함을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0052] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 의사체액 처리 시간에 따라 HA의 코팅율이 상이함을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0053] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 제조된 콜라겐/HA 스캐폴드의 마이크로채널화, 기계적 강도, 단백질 흡수능이 우수함을 확인하고, 제작된 스캐폴드 내 HA의 중량비는 약 38.87%를 차지함을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0054] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 인간 지방 유래 줄기세포를 포함한 스캐폴드의 분화, 배양 및 세포실험을 수행한 결과, 지방 유래 줄기세포가 본 발명의 스캐폴드의 내부에서도 마이크로채널 구조에 의해 생존율이 우수하며, 골 분화 마커들이 잘 발현됨을 확인하였다(실시예 6 참조).
- [0056] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0058] 본 발명은 (a) 폴리비닐알코올(Poly(vinyl alcohol): PVA) 및 생체적합성 고분자를 포함하는 잉크를 압출하여 구조체를 제조하는 단계;
- [0059] (b) 상기 구조체를 침지하여 PVA를 침출하는 단계;
- [0060] (c) 상기 PVA가 침출된 구조체를 콜라겐으로 코팅하는 단계;
- [0061] (d) 상기 콜라겐 코팅된 구조체를 유기용매에 담지하여 생체적합성 고분자를 제거하는 단계; 및
- [0062] (e) 상기 생체적합성 고분자가 제거된 구조체를 하이드록시아파타이트(HA)로 코팅하는 단계;를 포함하는, 마이크로채널화된 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [0063] 본 발명에서, 스캐폴드란 조직공학 분야에서 중요한 기본 요소 중의 하나로서 세포의 부착, 분화 및 조직 주변으로부터 이동되는 세포의 증식과 분화에 적합한 환경을 제공하는 역할을 하는 구조물을 의미한다. 구체적으로는, 조직공학 기술은 인공피부, 인공뼈, 인공연골, 인공각막, 인공혈관 및 인공근육 등 인체의 거의 모든 장기에 적용되고 있는데, 이러한 생체조직 및 장기의 재생을 최적화하기 위해서는 기본적으로 생체조직과 유사한 스캐폴드가 제공되어야 한다. 이상적인 스캐폴드의 기본 요건은 크게 무독성, 기계적 물성 그리고 다공성을 들 수 있다.
- [0064] 본 발명에서, 상기 PVA는 분자량이 10 내지 200 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$, 10 내지 180 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$, 10 내지 150 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$, 10 내지 130 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$, 10 내지 110 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$, 10 내지 100 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$, 또는 약 100 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ 이하일 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는, 낮은 분자량 (Low M_w , 31-50 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)과 중간 분자량 (Mid M_w , 89-98 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)의 PVA에서 PCL 마이크로 입자를 보이지만 높은 분자량 (High M_w 146-186 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)에서는 Rayleigh disturbance 현상에 의해 분자구조가 깨져 혼탁한 혼합이 발생함을 확인하였다.

- [0065] 본 발명에서, 상기 (a) 단계의 잉크는 PVA 및 생체적합성 고분자가 3 : 1 내지 20, 3 : 1 내지 15, 3 : 3 내지 15, 3 : 3 내지 12, 3 : 5 내지 12, 3 : 5 내지 11, 3 : 5 내지 10, 3 : 5 내지 9, 3 : 5 내지 8, 3 : 5 내지 7, 3 : 6 내지 12, 3 : 6 내지 11, 3 : 6 내지 10, 3 : 6 내지 9, 3 : 6 내지 8, 3 : 6 내지 7, 3 : 6.5 내지 7.5 또는 약 3 : 7의 중량비율로 포함된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 본 발명에서, 상기 생체적합성 고분자는 합성 고분자 또는 천연 고분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명에서, 상기 합성 고분자는 폴리-ε-카프로락톤(polycaprolactone, PCL), 폴리-락틱-코-글리콜릭산 (Poly(lactic-co-glycolic acid): PLGA), 및 폴리락틱산(Polylactic acid: PLLA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명에서, 상기 천연 고분자는 콜라겐(collagen), 키토산(chitosan), 알지네이트(alginate), 및 젤라틴(gelatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에서, 상기 (b) 단계의 침지는 10 내지 80 °C, 20 내지 70 °C, 30 내지 60 °C, 40 내지 60 °C, 또는 약 50 °C의 조건에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명에서, 상기 (b) 단계의 침지는 물, 인산완충액 (PBS; phosphate buffered-saline), 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] *본 발명에서, 상기 (c) 단계의 콜라겐 코팅은 0.5 내지 10 중량%, 1 내지 10 중량%, 1 내지 9 중량%, 1 내지 8 중량%, 1 내지 7 중량%, 1 내지 6 중량%, 1 내지 5 중량%, 1 내지 4 중량%, 2 내지 8 중량%, 2 내지 7 중량%, 2 내지 6 중량%, 2 내지 5 중량%, 2 내지 4 중량%, 3 내지 8 중량%, 3 내지 7 중량%, 3 내지 6 중량%, 3 내지 5 중량%, 3 내지 4 중량%, 3.5 내지 4.5 중량%, 또는 약 4 중량%의 콜라겐으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 본 발명에서, 상기 (d) 단계의 유기용매는 아세톤(Acetone, AC), 클로로폼(chloroform, CF), 디메틸설폭시드(DMSO), N-메틸-2-피롤리돈(NMP), 디메틸포름아마이드(Dimethylformamide, DMF), 다이클로로에테인(Dichloroethene; DCE), 및 디클로로메탄(Dichloromethane; DCM)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는, 유기용매로 디클로로메탄을 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명에서, 상기 (e) 단계의 HA 코팅은 의사체액을 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 의사체액은 증류수, NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , 및 NaHCO_3 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명에서, 상기 단계 (c)는 (c-1)상기 PVA가 침출된 구조체를 콜라겐 하이드로겔로 코팅하는 단계; 및
- [0076] (c-2)상기 콜라겐을 가교화하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명에서, 상기 콜라겐의 가교화는 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필)카보디이미드(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide; EDC)와 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS)를 포함하는 용액에 콜라겐 코팅된 구조체를 담지함으로써 수행될 수 있으나, 당업계에 공지된 방법을 사용하는 등 상기 방법에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명에서, 상기 스캐폴드는 세포 증식 또는 분화 효과가 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 또한, 본 발명은 콜라겐 및 하이드록시아파타이트(HA)를 포함하는 마이크로채널화된 스캐폴드로서, 상기 스캐폴드는 상기 방법으로 제조된 것을 특징으로 하는, 마이크로채널화된 스캐폴드를 제공한다.

- [0081] 본 발명에서, 상기 스캐폴드는 다공성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 다공성이란 기공(pore), 채널(channel) 및 케이지(cage)의 배열을 지칭하며, 기공, 채널 및 케이지의 배열은 불규칙적이거나 규칙적 또는 주기적일 수 있다. 또한, 상기 기공 또는 채널은 분리되거나 상호 연결될 수 있고 1차원, 2차원 또는 3차원적일 수 있다.
- [0082] 본 발명에서, 상기 스캐폴드는 줄기세포(stem cell), 골아세포(osteoblast), 조연골세포(chondroblast), 근원세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 심근원세포(cardiomyoblast), 평활근세포(smooth muscle cell), 신경세포(neural cell), 및 혈관세포(vascular cells)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포를 증식 또는 분화시키는 용도일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0083] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 미분화 상태이면서, 무한정 증식, 골세포로의 분화능 또는 혈관세포로의 분화능을 갖는 세포라면 특별히 제한되지는 않는다. 구체적으로 줄기세포로는 배아줄기세포, 성체 줄기세포, 배아생식 줄기세포, 배아중양 줄기세포 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0084] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 골 세포로 분화될 수 있는 세포라면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0085] 본 발명에서, 상기 스캐폴드는 골 재생용 또는 혈관 신생 유도용일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0086] 본 발명에서, 상기 마이크로채널은 공극(pore) 직경이 1 내지 30 μm , 5 내지 30 μm , 5 내지 25 μm , 5 내지 20 μm , 10 내지 30 μm , 10 내지 25 μm , 10 내지 22 μm , 10 내지 20 μm , 15 내지 30 μm , 15 내지 25 μm , 15 내지 22 μm , 15 내지 20 μm , 18 내지 30 μm , 18 내지 25 μm , 18 내지 22 μm , 18 내지 21 μm , 19 내지 21 μm , 또는 약 20 μm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0088] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0090] **[실시예]**
- [0091] **실시예 1. 콜라겐/하이드록시아파타이트 스캐폴드의 제조**
- [0092] 도 1에 도시된 플로우차트에 따라, 콜라겐/하이드록시아파타이트 마이크로채널화된 스캐폴드를 제작하였다.
- [0093] 먼저, 3차 증류수에 PVA 분말(밀도 1.27 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; Mn 89,000-98,000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)를 넣고 95°C에서 약 15분간 용해시켜 (PVA fibrillation), PVA 용액 (20 중량%)을 만들었다. 그 후 PVA 용액을 PCL (Mn 45,000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)과 7(PCL): 3(PVA)의 질량 비율로 혼합하였다.
- [0094] PVA/PCL 혼합용액의 수분을 120°C에서 1시간 동안 증발시켰다. 수분이 증발된 PVA/PCL 혼합물을 3D 프린터를 이용해 프린팅을 진행하였다. 인쇄된 구조체는 $5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$ 크기로 제작하였으며, 제작 시 구조체의 크기는 디자인에 따라 수정이 가능하도록 하였다. 프린팅 시에는 마이크로 크기의 노즐 내부에서 작용하는 전단응력을 통해, PVA와 PCL이 프린팅 방향으로 배열되도록 하였다. 프린팅된 PVA/PCL 구조체를 50°C의 3차 증류수에 3일간 침지함으로써 PVA를 제거하여 (PVA leaching) 배열된 PCL 섬유가닥으로 이루어진 구조체를 수득하였다.
- [0095] 수득된 PCL 섬유 구조체는 콜라겐 마이크로채널 구조를 제작하기 위한 몰드로 사용하였다. PCL 섬유구조체 몰드를 4중량%의 콜라겐 하이드로겔로 코팅한 뒤, 50 mM EDC/NHS 용액을 이용하여 상온에서 24시간 동안 콜라겐을 가교하였다. 이후 24시간 동안 디클로로메탄에 PCL/콜라겐 구조를 담지하여 PCL이 제거된 마이크로채널 콜라겐 구조체를 제작하였다. 잔여 용매는 95% 에탄올 용액을 이용하여 제거하였다.
- [0096] 10X 의사체액 (SBF)은 1L의 3차 증류수에 NaCl (58.443 g), KCl (0.373 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3.675 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.016 g), NaH_2PO_4 (1.199 g), NaHCO_3 (0.840 g)를 순차적으로 첨가하여 제조하였다. 본 연구에서는 제작된 구조체에 하이드록시아파타이트(HA)를 코팅하기 위해 마이크로채널 콜라겐 구조체를 10X 의사체액에 37°C에서 2 시간동안 침지시켰다.

[0097] 최종적으로, 하이드록시아파타이트로 코팅된 콜라겐 마이크로채널이 제작되었다.

[0099] **실시예 2. PCL 미세섬유 다발의 특성 확인**

[0100] 혼합된 두 고분자가 전단력 및 인장력에 노출되는 상황에 따른 모식도를 확인하고, 도 2a에 나타내었다. 두 고분자의 유변학적 특성이 혼합액의 혼합성을 결정하였다. 결과적으로 두 고분자의 점성비가 1보다 극명히 높을 때 Rayleigh disturbance가 발생하여 기반 고분자 내에 분포된 혼합된 고분자의 결합이 깨져 분포된 혼탁한 혼합 현상 (Miscible blending)이 발생하였다. 그러나 반대로 점성비가 1보다 작을 때에는 깨지지 않고 마이크로 섬유 형태를 형성하는 현상 (Immiscible blending)이 발생하였다. 이 때 노즐을 원뿔형 분할 (Tapering region)과 원통형 분할 (Cylindrical region)로 나눌 수 있다.

[0101] 도 2b는 원뿔형 분할 내에서 혼합된 용액의 주사전자현미경 이미지를 나타낸 것이다. 낮은 분자량 (Low M_w , 31-50 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)과 중간 분자량 (Mid M_w , 89-98 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)의 PVA에서 PCL 마이크로 입자를 보이지만 높은 분자량 (High M_w 146-186 $\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)의 PVA에서는 (PVA와 PCL의 점성비가 1보다 높아지게 됨) 상기에 적시된 Rayleigh disturbance 현상에 의해 분자구조가 깨져 혼탁한 혼합이 발생하였다. 즉, 분자량이 높아질수록 유변학적 특성이 높아진 것으로 판단하였다.

[0102] 또한, 도 2c에 나타난 바와 같이 원통형 분할에서는 섬유로 형성된 구조를 확인할 수 있었다. 특히 중간 분자량의 PVA가 가장 효과적으로 배열된 섬유를 보여주기 때문에 본 발명에서는 중간 분자량의 PVA와 PCL을 혼합한 용액을 사용해 마이크로채널화 된 스캐폴드를 제작용 몰드를 인쇄하는 데에 사용하기로 선정하였다.

[0104] **실시예 3. 콜라겐 하이드로젠 중량비에 따른 마이크로채널화된 콜라겐 구조 확인**

[0105] 도 3a 및 3c에 나타난 바와 같이, 4 중량%보다 낮은 콜라겐을 이용하였을 시 약한 결합력으로 인해 마이크로채널 구조가 무너졌으며, 6 중량% 이상의 콜라겐을 이용한 경우에는 높은 점도로 인하여 외부 표면의 배열된 구조가 사라지는 것을 확인하였다.

[0106] 또한, 도 3b에 나타난 바와 같이, 콜라겐 농도에 관계없이 마이크로채널의 공극 직경이 약 20 μm 임을 확인하였다.

[0107] 따라서, 최적 콜라겐 농도를 4 중량%로 설정하고, 이후 실험을 진행하였다.

[0109] **실시예 4. 의사체액 처리 시간에 따른 HA 코팅 결과 확인**

[0110] 도 4b에 나타난 바와 같이, 처리시간이 2시간 미만 일 경우 HA 코팅 형성이 불완전하였으며, 약 3시간을 처리한 경우에는 HA가 과도하게 코팅되어 마이크로채널 내부를 막는 현상이 발생하였다.

[0111] 또한, FE-SEM의 EDS 맵핑 분석 방법을 통해 표면에 포함된 원소를 측정하여 Ca:P 비율을 계산하였다.

[0112] 도 4c는 칼슘과 인의 비율 (Ca:P)을 보여주며, 그 결과 2시간과 3시간 동안 코팅을 진행하였을 때 인체 골의 비율인 1.67에 가장 가까웠다.

[0113] 따라서 마이크로채널 보존과 인체 골 Ca:P 비율에 따라 최적 HA 처리시간을 2시간으로 설정하고, 이후 실험을 진행하였다.

[0115] 형성된 HA를 확인하기 위해 XRD를 활용하였다. 스캐폴드의 X선 회절 (XRD) 분석은 40 kV 및 20 mA의 빔 조건 하에서 CuK^2 방사선으로 X'Pert PRO MRD (PANalytical; Malvern Instruments, UK) 사용하여 수행하였다.

[0116] 도 4d에 나타난 바와 같이 전형적인 HA의 피크인 [002], [102] 및 [211] 피크를 확인하였다.

[0118] **실시예 5. 구조체의 배양 및 특성 분석**

- [0119] 본 발명의 방법을 통해 제작한 콜라겐/HA 마이크로채널 구조체(MC-스캐폴드)의 성능을 평가하기 위해, 대조군으로서 일반적인 방식으로 프린팅한 뒤, MC-스캐폴드와 같은 방법으로 HA가 코팅된 LC-스캐폴드를 사용하였다.
- [0120] LC 스캐폴드는 인쇄와 동시에 잉크를 동결시켜 구조체를 얻을 수 있는 극저온 인쇄 방식을 사용하여 제작되었다. 4 wt% 콜라겐 하이드로겔을 전체 구조체 크기 $5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$, 구조체에 포함된 가닥과 공극의 크기 $500 \text{ }\mu\text{m}$ 으로 (MC-스캐폴드와 동일) 인쇄와 동시에 동결시켰다. MC-스캐폴드와 마찬가지로 EDC/NHC 용액으로 상온에서 가교를 진행한 후 동결건조를 거쳐 LC-스캐폴드를 제작하였다.
- [0121] 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, LC-스캐폴드는 마이크로채널화가 이루어지지 않은 반면, MC-스캐폴드는 마이크로채널화가 잘 이루어져있음을 확인하였다.
- [0122] 또한, 도 5c에 나타난 바와 같이, LC-스캐폴드와 비교하여 MC-스캐폴드의 기계적 강도가 현저히 우수하며, 특히 의사체액 처리 후 HA가 코팅된 상태의 MC-스캐폴드(MC(Post-SBF))의 기계적 강도가 우수함을 확인하였다.
- [0123] 또한, 도 5d에 나타난 바와 같이, LC-스캐폴드와 비교하여 MC-스캐폴드의 압축 강도가 현저히 우수하며, 특히 의사체액 처리 후 HA가 코팅된 상태의 MC-스캐폴드(MC(Post-SBF))의 압축 강도가 우수함을 확인하였다. 이는 도 5e에 나타난 바와 같이 동일한 소재(콜라겐과 HA)로 구성되었으나 MC-스캐폴드가 다공성이 다소 낮기 때문인 것으로 판단된다.
- [0124] 또한, 도 5e에 나타난 바와 같이, 다공성은 LC-스캐폴드보다 MC-스캐폴드가 낮은 것으로 나타났는 바, MC-스캐폴드는 다공성이 낮기 때문에, LC 스캐폴드에 비해 기계적으로 우수한 것을 확인하였다.
- [0125] 또한, 도 5f에 나타난 바와 같이, LC-스캐폴드와 비교하여 MC-스캐폴드의 단백질 흡수능이 우수한 것으로 나타났다.
- [0126] 또한, 도 5g에 나타난 바와 같이, 의사체액 처리 후 HA가 코팅된 상태의 MC-스캐폴드(MC(Post-SBF)) 내 HA의 중량비는 약 38.87%를 차지함을 확인하였다.

[0128] **실시예 6. 제작된 스캐폴드에서의 인간 지방 유래 줄기세포의 활성 평가**

[0129] **5-1. 세포 배양**

- [0130] 인간 지방 유래 줄기세포(hASCs; human adipose-derived stem cells)가 포함된 스캐폴드($5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$)를 10% FBS (Gemini Bio-Products, USA)과 1% 항생제(Antimycotic; Cellgro, Manassas, VA)를 함유한 DMEM-low glucose (Sigma-Aldrich, USA) 배지에서 37°C , 5 % CO_2 조건 하에서 배양하였다. 배지는 2일에 한번씩 교체하였으며, 줄기세포의 골 분화유도에는 10% FBS, 1% 항생제, $1 \text{ }\mu\text{M}$ 텍사메타손, $50 \text{ }\mu\text{M}$ 아스코브산, 과 10 mM β -glycerol phosphate를 함유하는 DMEM-저글루코스 배지를 이용하였다.

[0132] **5-2. 세포 증식 테스트**

- [0133] 각 스캐폴드는 1일, 3일 및 7일 배양 후 세포 증식 키트 (Cell Proliferation Kit I; Boehringer Mannheim, Germany)를 이용해 MTT assay를 진행하였다. 배양을 진행한 구조체는 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)에 4시간 동안 반응 한 후 흡광도 570 nm 의 microplate reader를 이용해 측정하였다.

- [0134] 그 결과, 도 6c에 나타난 바와 같이, LC-스캐폴드와 비교하여, MC-스캐폴드에서 세포 증식률이 유의하게 높게 나타났다.

[0136] **5-3. 형광이미지 획득**

- [0137] 각 세포가 포함된 스캐폴드는 1일, 3일 및 7일 배양한 후 37°C 에서 30-60 분 동안 Cacein AM (생존세포 염색, 녹색) 과 Ethidiumhomodimer-1 (사멸세포 염색, 적색)을 처리하여 염색하고, 생존한 세포와 사멸한 세포를 형광 현미경으로 측정하였다.

[0138] 그 결과 도 6a에 나타난 바와 같이, 살아있는 세포와 죽은 세포를 염색한 형광사진에서 두 구조체 모두 표면 부분에서 높은 세포생존율을 보였으나, 14일차 및 21일차의 MC-스캐폴드는 스캐폴드 내부에서도 세포 생존율이 유의하게 높게 나타나, LC-스캐폴드와 달리 MC-스캐폴드가 마이크로채널화된 구조인 점에 기인한 것임을 확인할 수 있었다. 획득한 도 6a의 이미지에서 나타난 전체 세포 수 대비 생존한 세포 수의 백분율을 도 6b에 나타내었다.

[0140] 또한, 각 세포가 포함된 스캐폴드는 1일, 3일 및 7일 배양한 후 37℃에서 30 분 동안 DAPI (세포핵 염색, 파란색) 및 Phalloidin (F-actin 염색, 적색)을 처리하여 염색하고, 세포핵 및 F-actin을 형광현미경으로 측정하였다.

[0141] 도 6d에 나타난 바와 같이, LC-스캐폴드와 달리 MC-스캐폴드가 마이크로채널화된 구조임을 명확히 확인하였다.

[0143] 5-4. ALP 염색 및 ARS 염색 결과

[0144] 배양된 스캐폴드는 초기분화 마커인 알칼린 포스파테이즈(ALP) 염색을 위하여, 5-브로모-4-클로로-3-인돌일-포스페이트 (BCIP)와 니트로 블루 테트라졸륨 (NBT) 혼합 용액에 1시간 이상 처리하였다. ALP가 발현된 세포는 청색 내지 자색을 띤다.

[0145] 또한, 세포의 골화 (석회화; calcification; 골로 분화 된 것을 확인)를 확인할 수 있는 칼슘 침착 (calcium deposition) 확인을 위한 Alizarin Red S (ARS) staining 염색을 수행하였다. ARS 용액에 스캐폴드를 1시간 이상 처리하였다. 석회화된 세포는 적색 내지 짙은 갈색을 띤다.

[0146] 그 결과 도 6e에 나타난 바와 같이, LC-스캐폴드와 달리 MC-스캐폴드가 마이크로채널화된 구조임을 명확히 확인하면서, MC-스캐폴드에서 골화가 잘 이루어짐을 확인하였다.

[0148] 5-5. 골 분화 마커 발현 확인

[0149] 골 분화 마커인 RUNX-2(Runt-related transcription factor 2), ALP(*Alkaline Phosphatase*), BMP-2(*Bone morphogenetic protein 2*), OPN(*Osteopontin*), OCN(*osteocalcin*) 및 beta actin의 발현 정도를 정량적으로 측정하기 위해 배양 14, 21 일 후에 RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction)을 수행하였다. RT-PCR에 이용하기 위한 총 RNA는 TRI reagent (Sigma-Aldrich)를 사용하여 분리하였고, 분리된 RNA의 순도와 농도는 분광광도계 (FLX800T; Biotek, USA)로 측정하였다. 역전사 시스템을 사용하여 RNase-free DNase를 처리한 총 RNA (500 ng)로부터 cDNA를 합성하였으며, Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하여 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)으로 qRT-PCR을 수행하였다. 그리고 TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)를 사용하여 골분화 마커 발현을 정량한 후, beta actin 값으로 나누었다. 사용한 프라이머의 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0150]

	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
RUNX-2	cag tga cac cat gtc agc aa	gct cac gtc gct cat ttt g
ALP	ggc acc tgc ctt act aac tcc	gtg ggt ctc tcc gtc cag
BMP-2	cag acc acc ggt tgg aga	cca ctc gtt tct ggt agt tct tc
OPN	aag ttt cgc aga cct gac atc	ggg ctg tcc caa tca gaa gg
OCN	tga gag ccc tca cac tcc tc	acc ttt gct gga ctc tgc ac
beta actin	tcc aaa tat gag atg cgt tgt t	tgc tat cac ctc ccc tgt gt

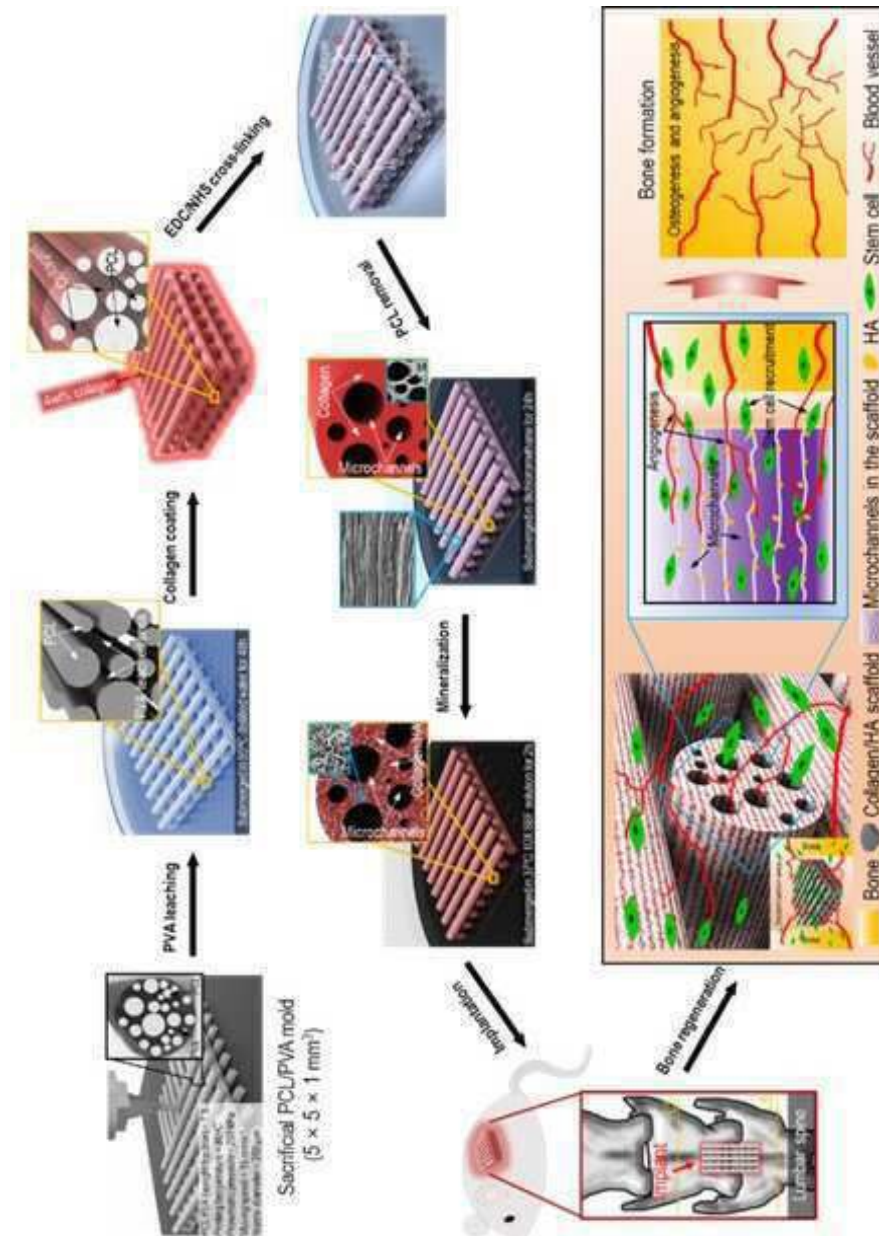
[0151] 도 6f에 나타난 바와 같이, 유전자 발현 측정 결과에서 LC-스캐폴드와 비교하여 MC-스캐폴드에서 골 분화와 관련된 상기 유전자들의 발현이 현저히 증가함을 확인하였다. 즉, hASC를 이용한 체외 실험을 통해 MC-스캐폴드에서 hASC가 보다 높은 증식 효율 및 골분화 (osteogenesis)를 보이는 것을 확인하였다.

[0153]

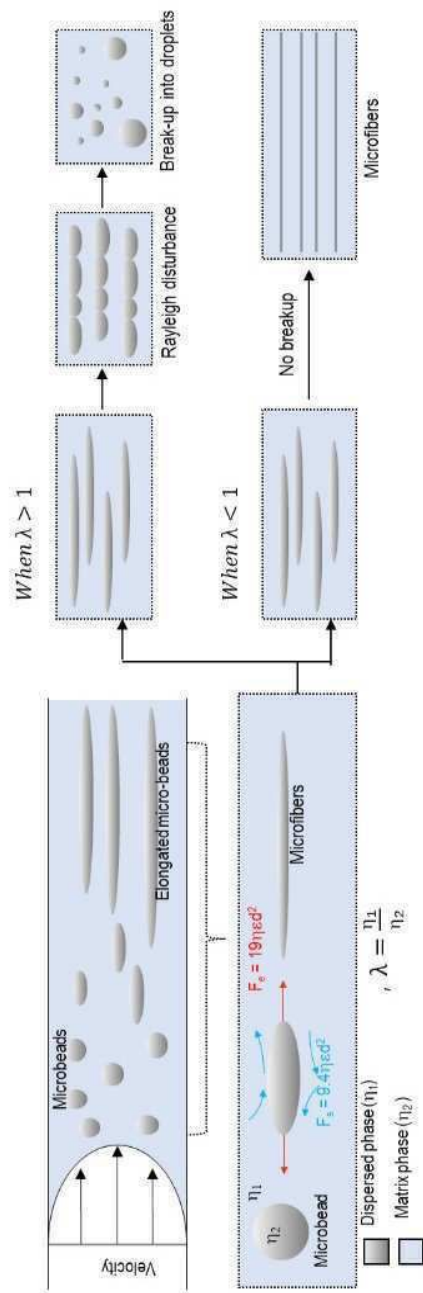
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

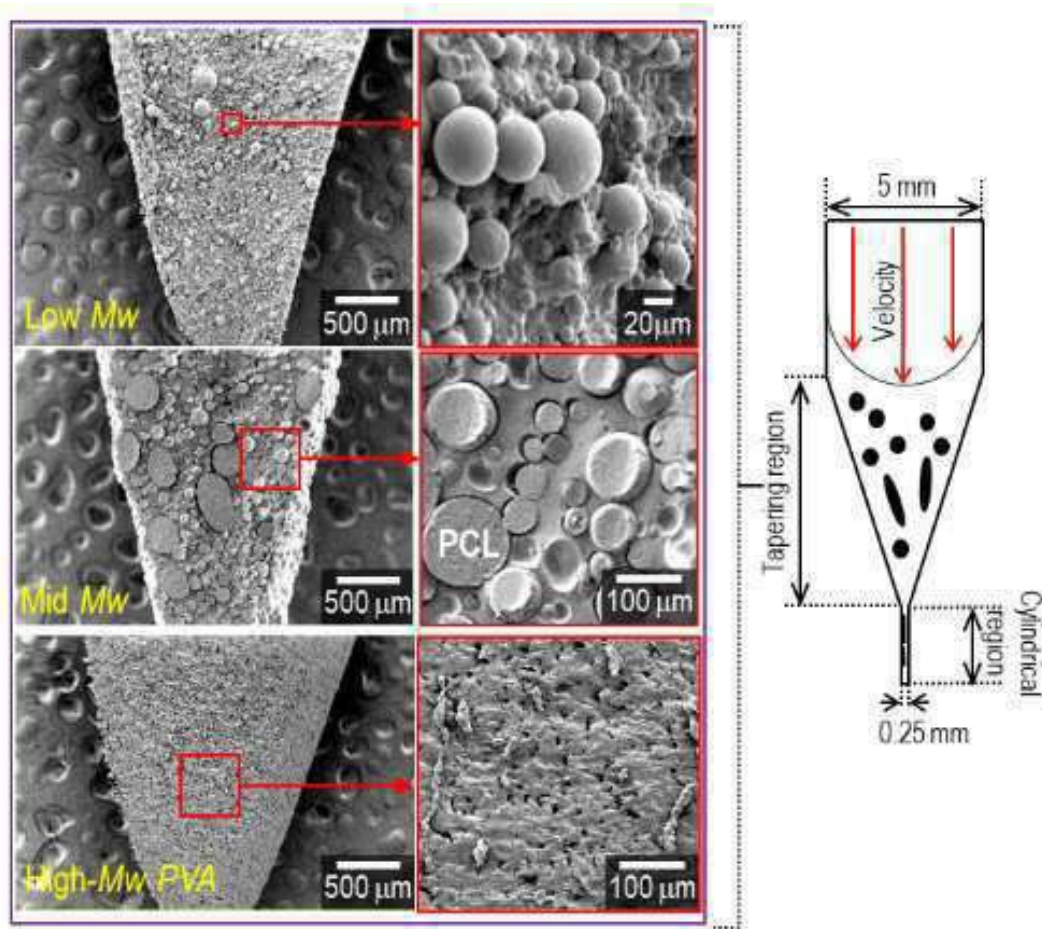
도면1



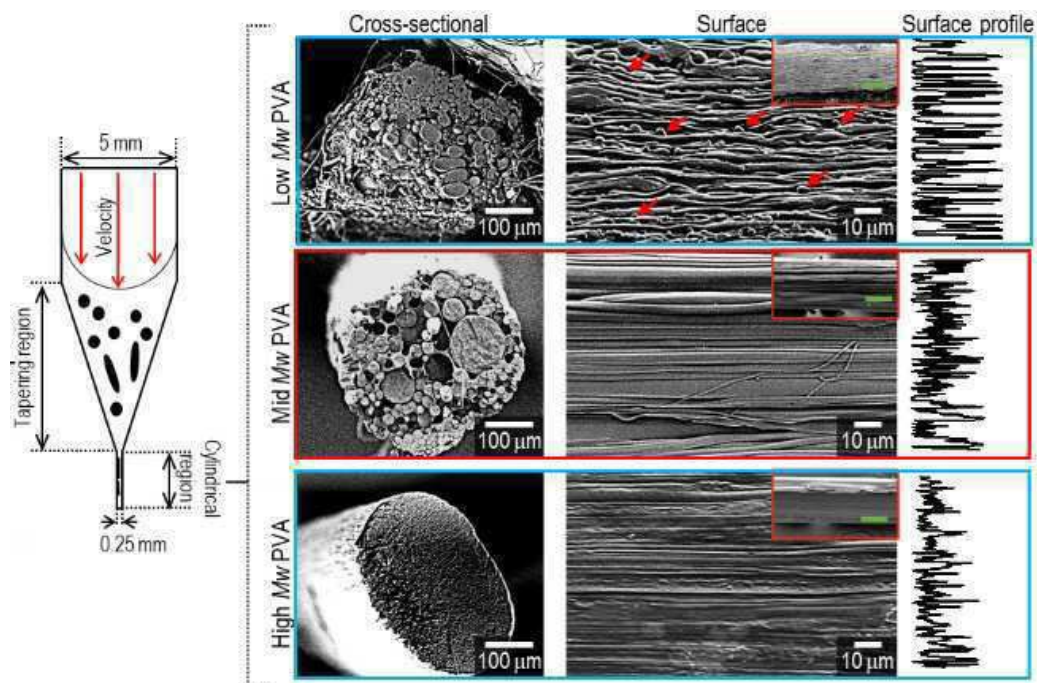
도면2a



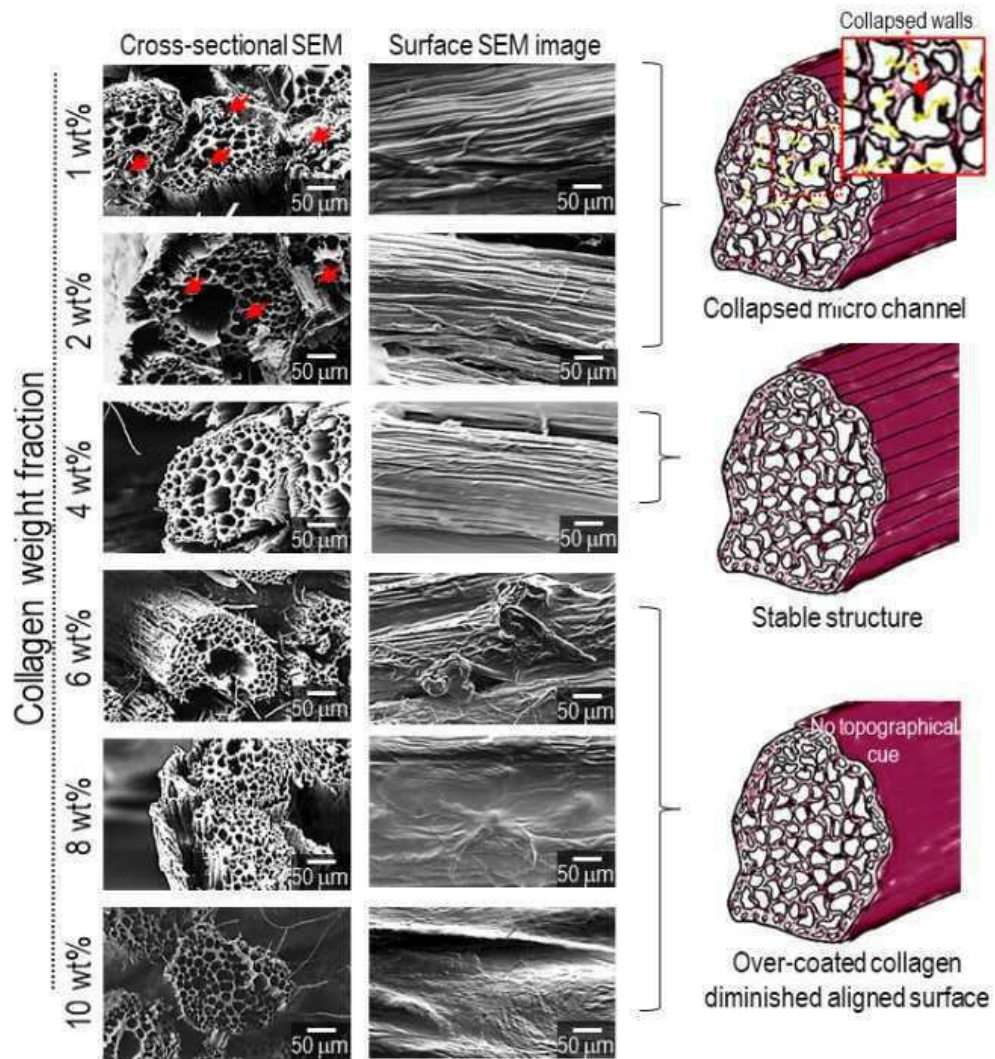
도면2b



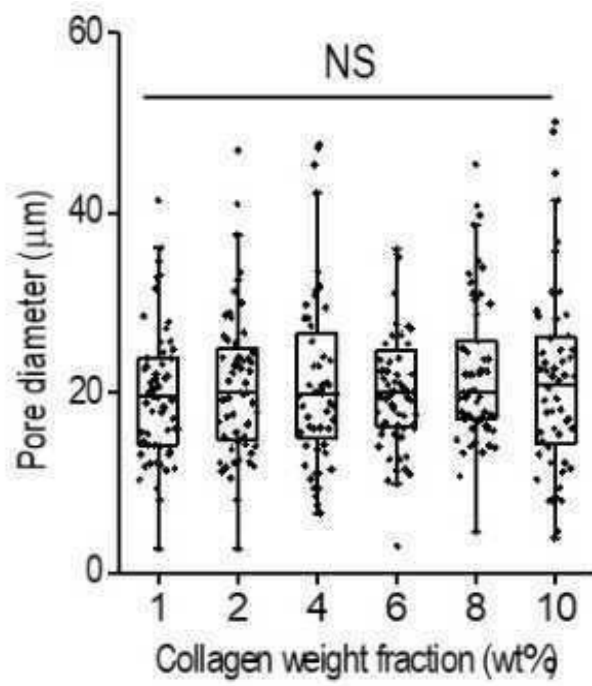
도면2c



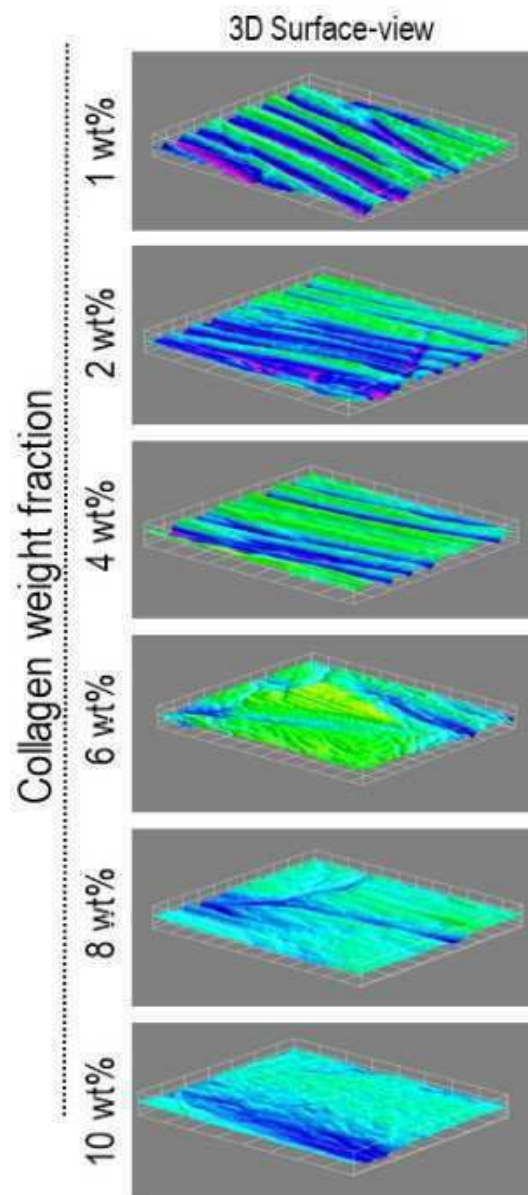
도면3a



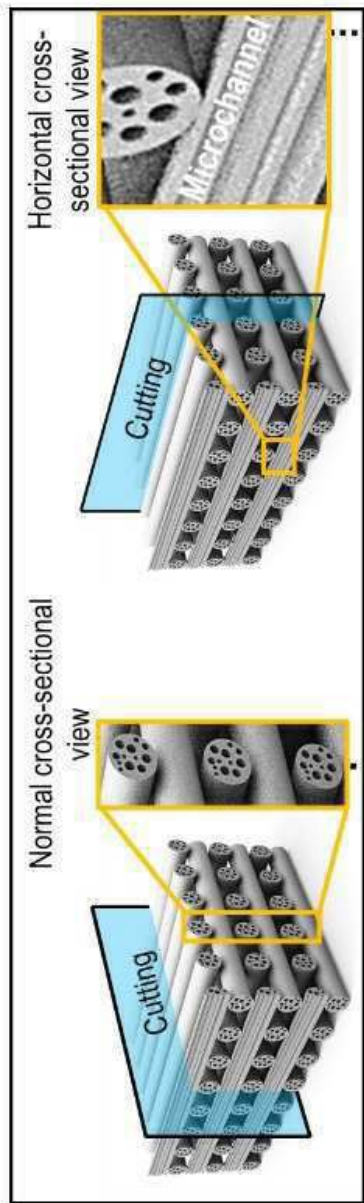
도면3b



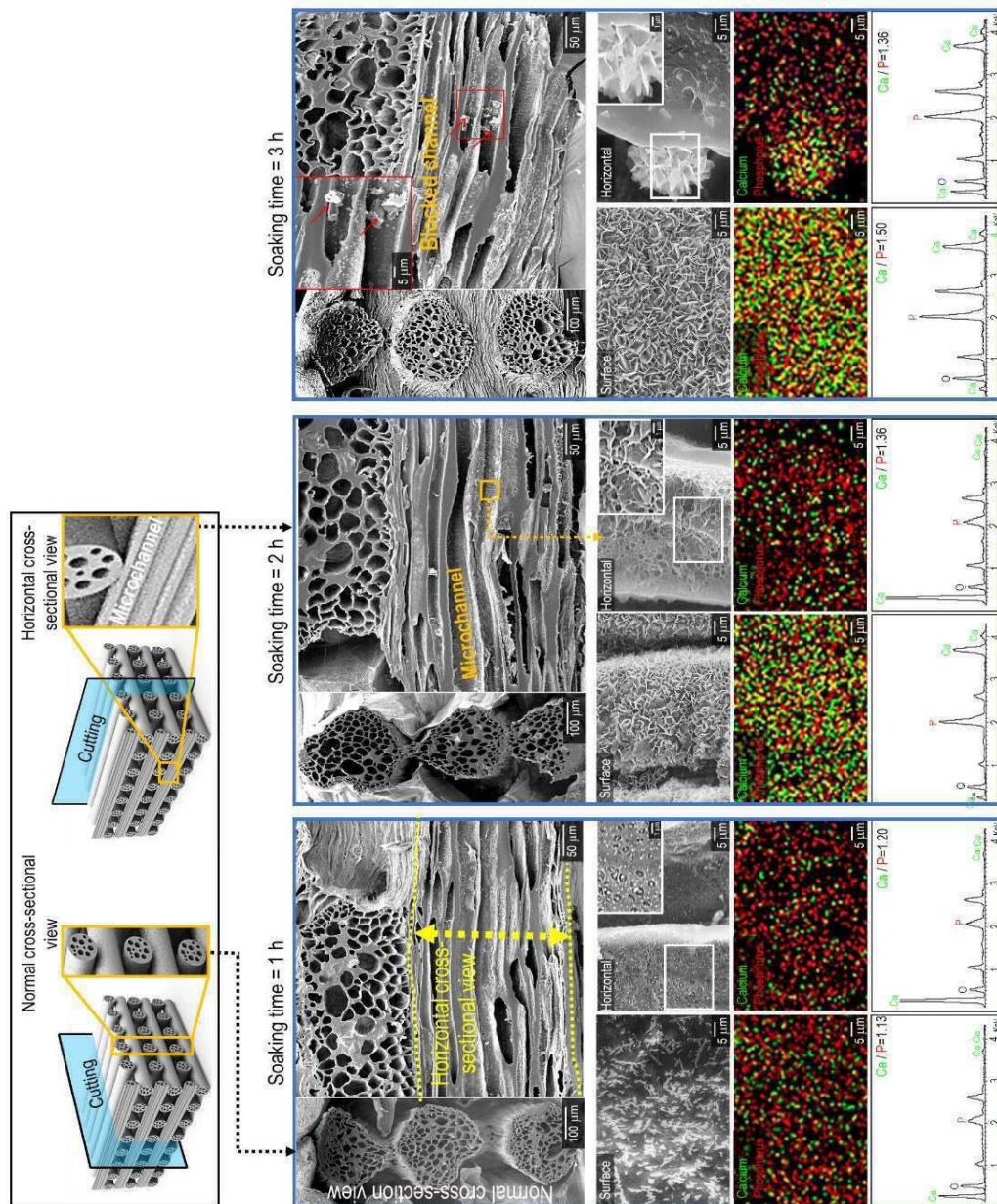
도면3c



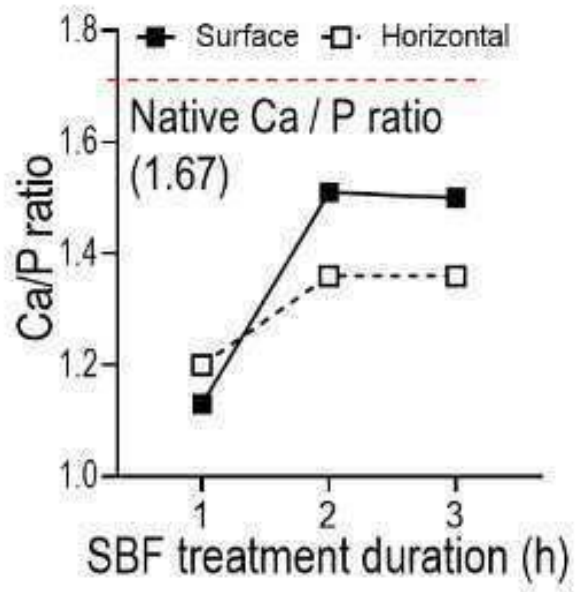
도면4a



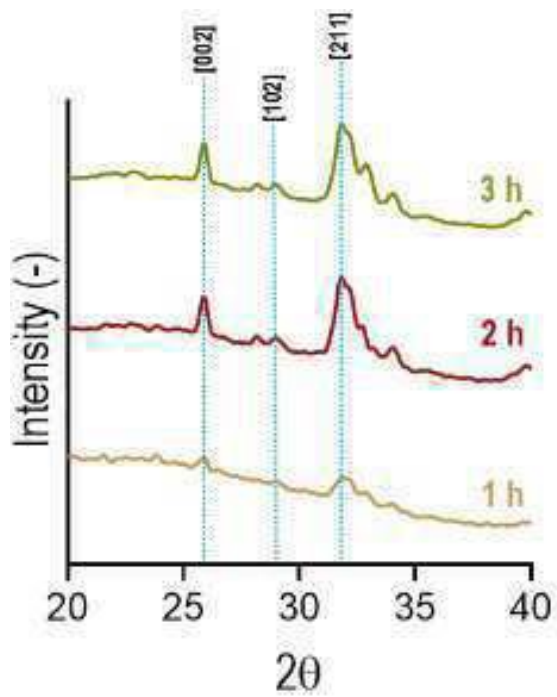
도면4b



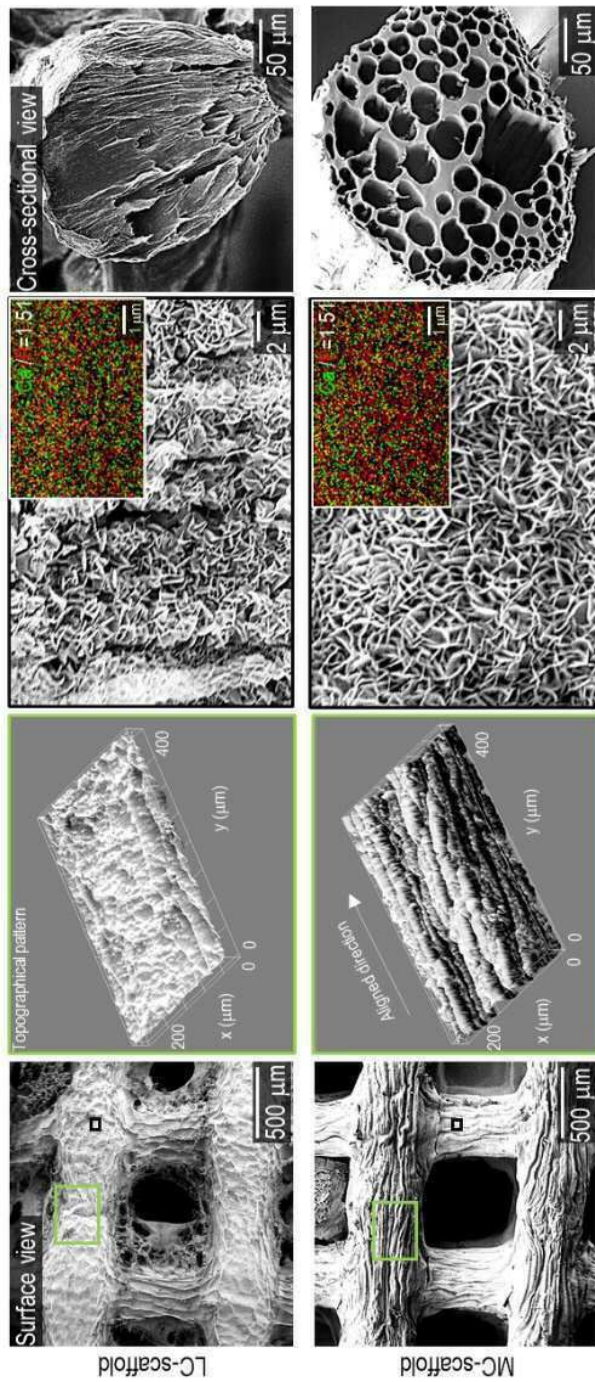
도면4c



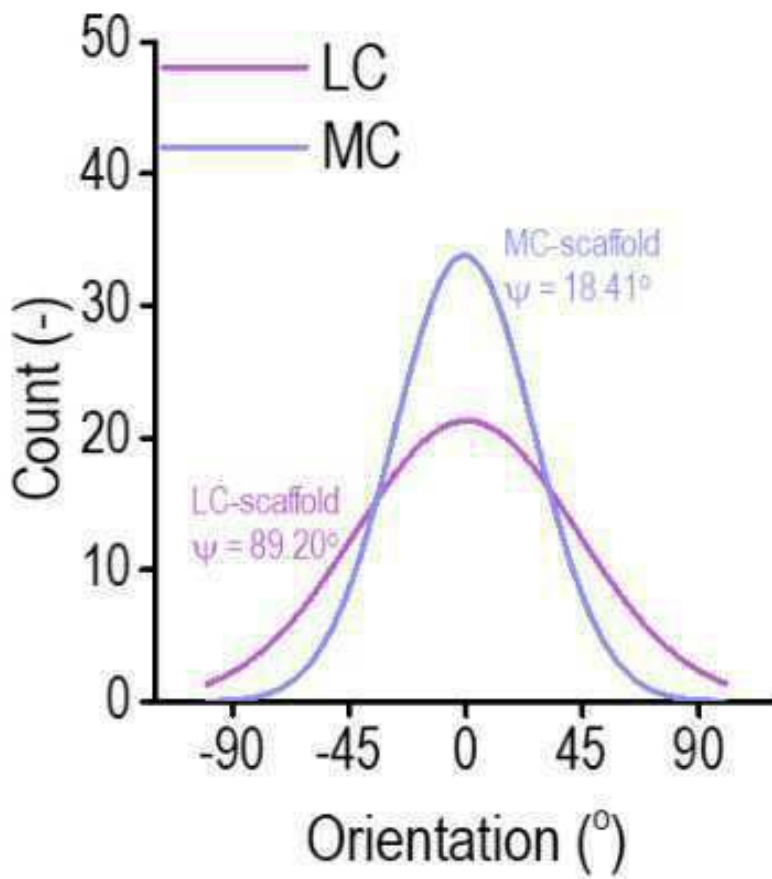
도면4d



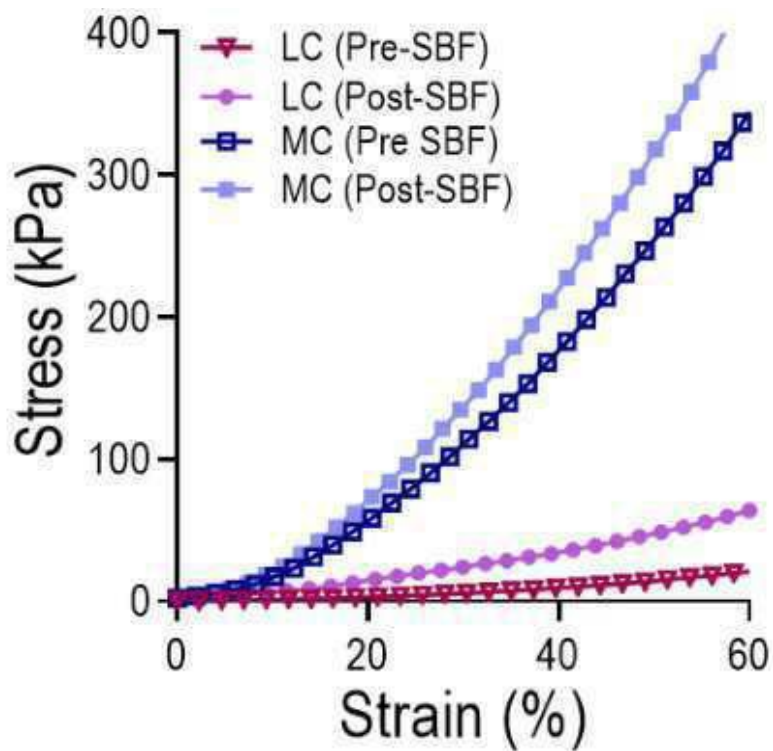
도면5a



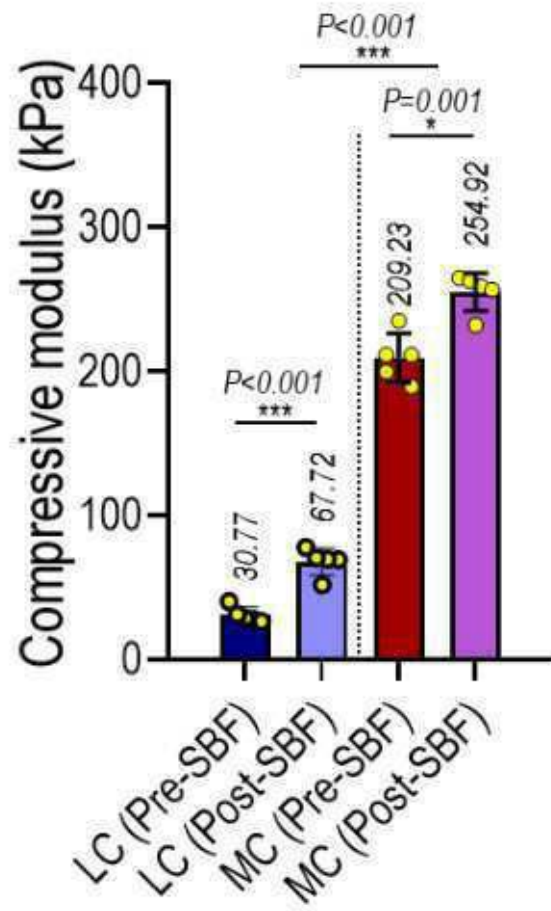
도면5b



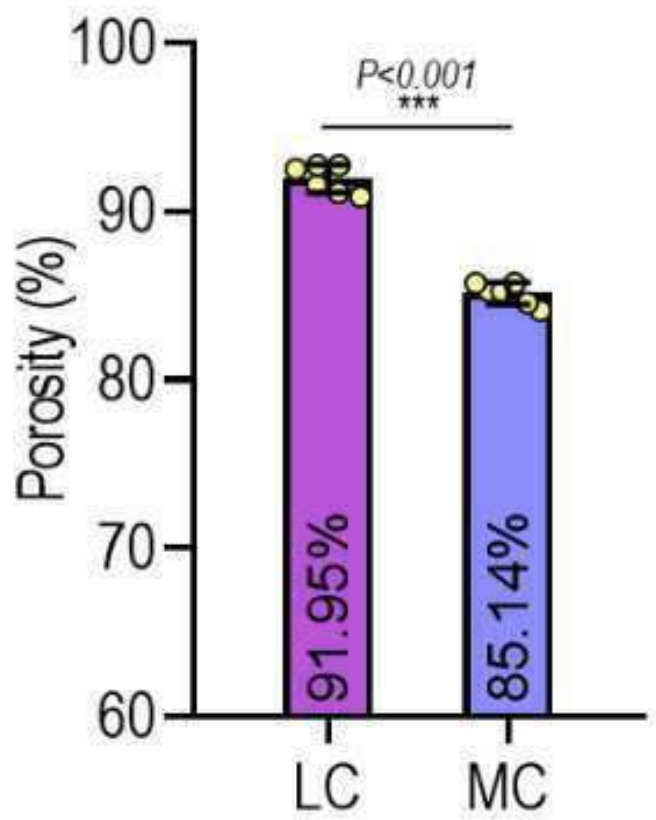
도면5c



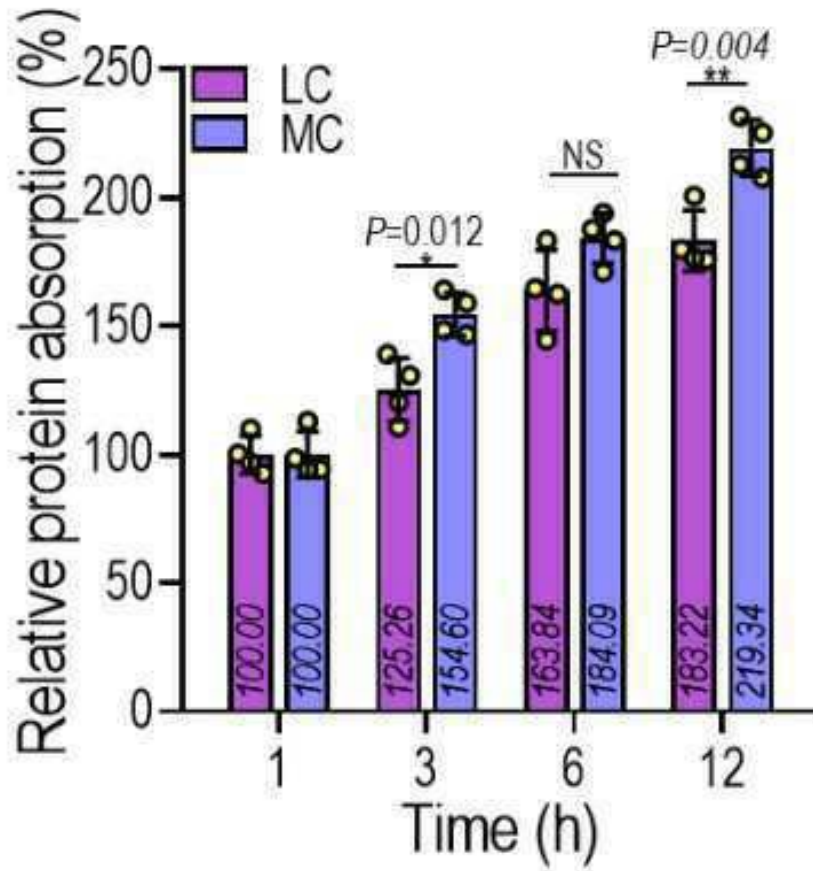
도면5d



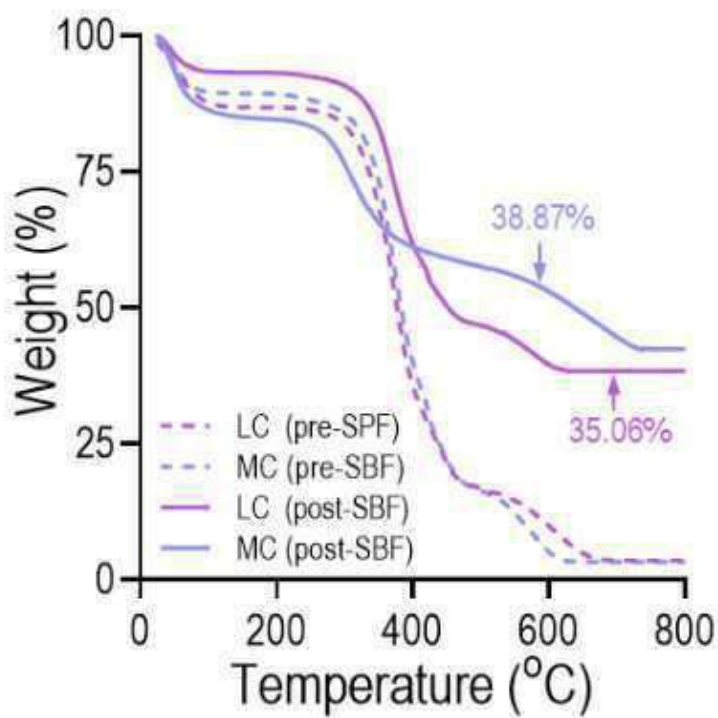
도면5e



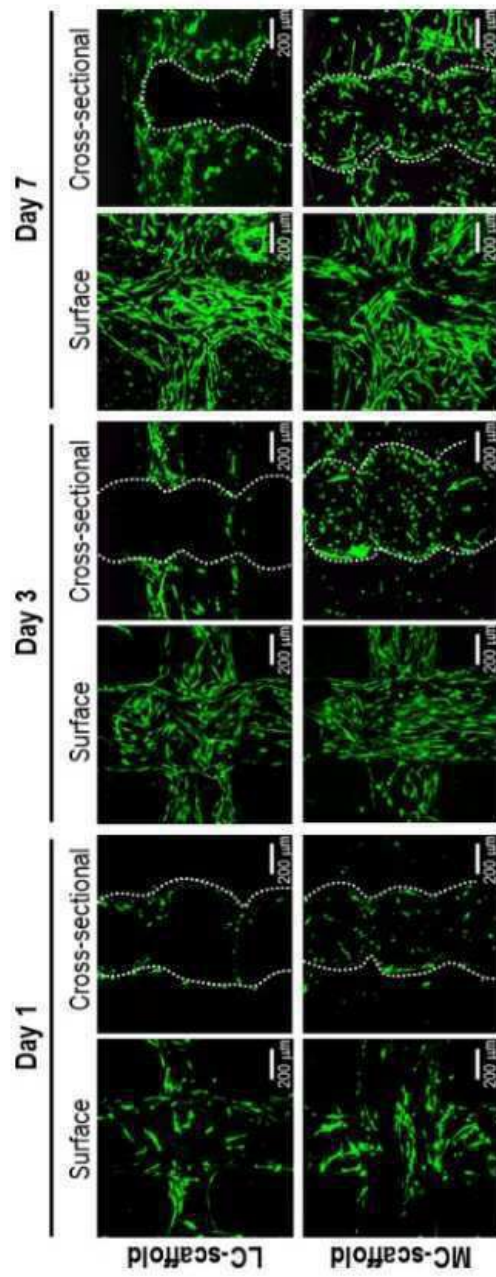
도면5f



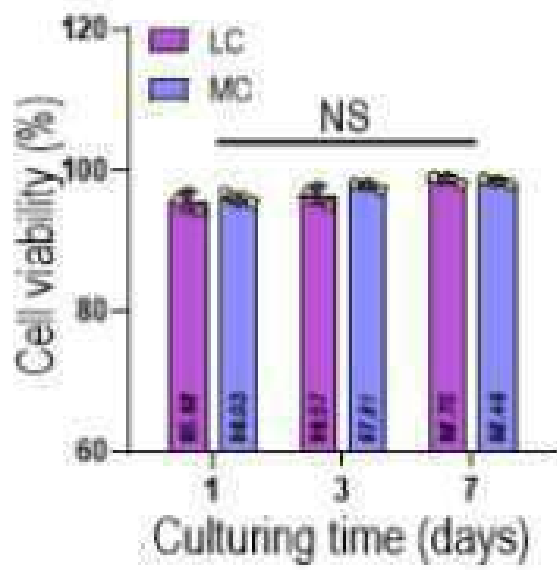
도면5g



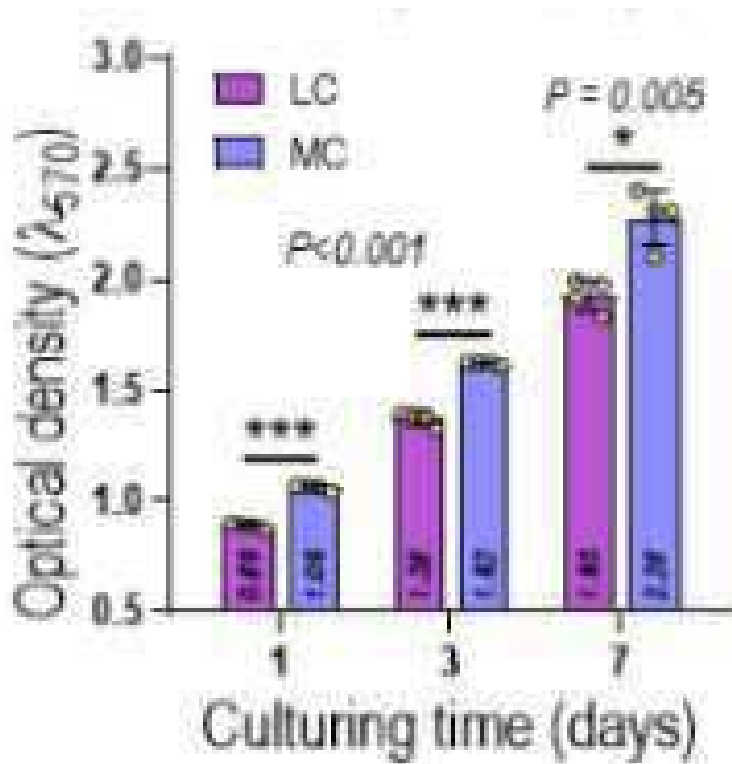
도면6a



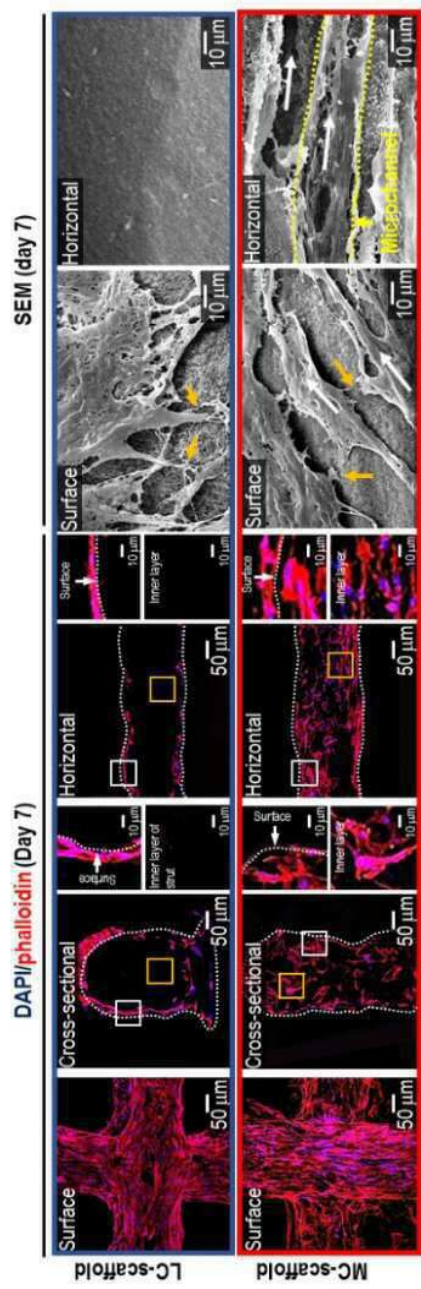
도면6b



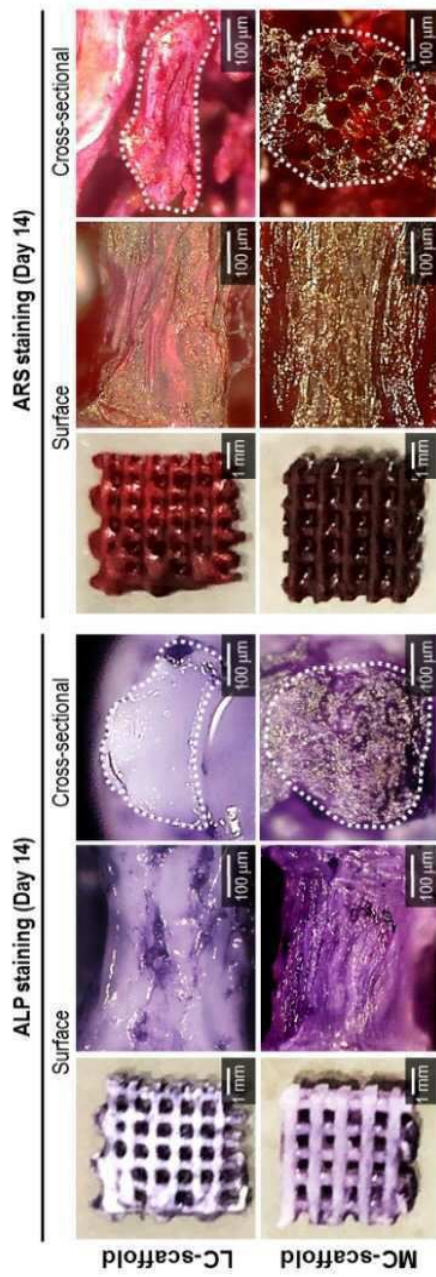
도면6c



도면6d



도면6e



도면6f

