



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0020325
(43) 공개일자 2024년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0654 (2013.01)
C12N 2506/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0097301

(22) 출원일자 2022년08월04일

심사청구일자 2022년08월04일

(71) 출원인

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

임기택

강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트
112동 2308호

뎀 두타 사안

강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명
과학대학 1호관 307동 206호

강글리 케아

강원특별자치도 춘천시 강원대학길 1, 농업생명과
학대학 1호관 307동 206호 (효자동)

(74) 대리인

구현서

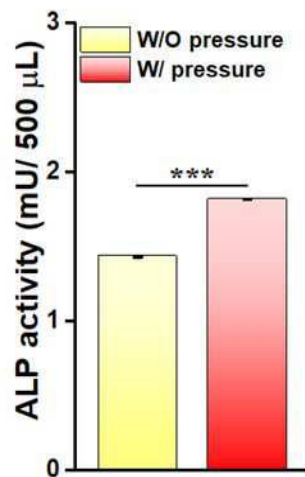
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 맥동압력 자극 기술을 이용한 줄기세포의 골형성 분화 촉진 방법 및 그 응용

(57) 요약

본 발명은 하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골형성 분화를 촉진하는 방법 및 그 응용에 관한 것으로, 본 발명은 5-20 kPa의 맥동 압력(평균 15.78 ± 4.5 kPa)이 세포 접착, 증식, 세포 사멸, 뼈 광물화, 칼슘 항상성, 이온 채널 조절, ROS 및 염증을 포함한 상당한 세포 반응에서 DEG가 있는 hBMSC에서 골형성을 증가시켜 단기 박동 압력 자극이 골 형성 분화를 유의하게 촉진하여 골 재생 과정, 체외 골 이식편 생성 및 의료 기기 제작에 활용할 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

C12N 2527/00 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345306818
과제번호	2019R1D1A3A03103828
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(후속연구지원)
연구과제명	줄기세포 다분화 증진용 3D 나노하이브리드-멀티채널 자동화 바이오리액터 기술개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2019.11.01 ~ 2022.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345280875
과제번호	2018R1A6A1A03025582
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 대학중점연구소지원사업
연구과제명	강원지역 산림바이오매스 유래 '나노셀룰로오스 융복합 응용연구 허브' 구축
기 여 율	5/100
과제수행기관명	강원대학교 산림과학연구소
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345354507
과제번호	2022R1I1A3063302
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	미세전류 자극을 이용한 조직공학용 3D 프린팅 전도성 하이드로겔 패치 개발
기 여 율	45/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골형성 분화를 촉진하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하이드로겔은 메타아크릴레이트된 젤라틴(GelMA)-셀룰로오스 나노결정(CNC) 하이드로겔 (CeIMA)인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 골형성 분화를 촉진하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 골형성 분화를 촉진하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 골형성 분화를 촉진하는 방법.

청구항 5

하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하는 단계를 포함하는 줄기세포의 광물화를 촉진하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 하이드로겔은 메타아크릴레이트된 젤라틴(GelMA)-셀룰로오스 나노결정(CNC) 하이드로겔 (CeIMA)인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 광물화를 촉진하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 광물화를 촉진하는 방법.

청구항 8

하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하여 정적 배양 대비하여 상기 줄기세포의 BSP, OPN, RUNX2 및 ALP 유전자의 mRNA 발현 수준을 증가시키는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하여 상기 줄기세포의 IGFBP-2 사이토카인 분비를 증가시키는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하여 상기 줄기세포의 CTNNB1,

CTNNBIP1 및 CTHRC1 유전자를 상향 조절하고, FZD1, FERMT2 및 LGR4 유전자를 하향조절하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 맥동압력 자극 기술을 이용한 줄기세포의 골형성 분화 촉진 방법 및 그 응용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골절과 같은 정형외과적 부상은 연간 2백만 건 이상을 차지한다. 뼈 조직 공학(BTE)은 딱딱한 골격(약 $\geq 30\text{--}40\text{kPa}$), 줄기 세포 및 생리 활성 분자의 통합적인 작용을 통해 새로운 기능적 뼈를 재생하기 위해 널리 연구되었다. 이러한 노력에도 불구하고 새로운 뼈의 형성은 뼈 손상의 크기와 복잡성에 따라 여전히 몇 주가 소요된다.

[0003] BTE의 현재 과제 중 하나는 주사 가능하고 경제적이기 때문에 소프트 하이드로겔 기반 뼈 재생 의학 전략을 달성하는 것이다. 그러나 연질 하이드로겔은 연질 생리학적 기질 내($\sim 100\text{--}1000\text{Pa}$)에서 MSC의 직접적인 분화에 의해 막 내 골화를 통한 생리적 뼈 발달이 발생하더라도 골형성 분화에 필요한 충분한 기계적 및 기계적 전달 기반 자극을 제공하지 못하는 경우가 많다.

[0004] 온전한 골수 역학을 모방하는 부드러운 하이드로겔에서 인간 중간엽 줄기 세포(hMSC)의 골형성 분화를 조절하는데 몇 가지 주목할만한 발전이 있었다. 골 형태 형성 단백질 2(BMP-2) 보충에서 C2C12 근모세포의 증식 및 골형성 분화를 향상시키기 위해 분해 가능한 연질 하이드로겔($\sim 0.5\text{kPa}$)을 모방하는 골수의 제작이 보고되었다. 더욱이, 부드러운 하이드로겔($\sim 3\text{kPa}$)의 표면 패터닝 기반 나노어레이는 초점 접착 및 이온 채널 발현을 활성화하여 hMSC의 골형성 분화를 촉진하는 것으로 나타났다.

[0005] 뼈 결함은 전 세계적으로 많은 수의 뼈 이식을 필요로 한다. 그러나 뼈 이식편은 임상적 사용을 제한하는 잠재적인 단점이 있다. 더 높은 강성(약 $\geq 30\text{--}40\text{kPa}$)을 갖는 하이드로겔은 골 형성 회복 및 재생을 촉진하기 위해 뼈 이식편의 대안으로 광범위하게 연구된다. 그러나 연질 하이드로겔($\leq 1\text{kPa}$)에 대한 골형성 분화는 뼈 조직 공학의 현재 과제이다.

[0006] [선행 특허 문헌]

[0007] 대한민국 특허공개번호 제10-2021-0076153호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 줄기세포의 골형성 분화 촉진 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하는 단계를 포함하는 줄기세포의 골형성 분화를 촉진하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 메타아크릴레이트된 젤라틴(GelMA)-셀룰로오스 나노결정(CNC) 하이드로겔(CeIMA)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0011] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 중간엽 줄기세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 또 본 발명은 하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하는 단계를 포함하는 줄기세포의 광물화를 촉진하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 메타아크릴레이트된 젤라틴(GelMA)-셀룰로오스 나노결정

(CNC) 하이드로겔(GelMA)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0015] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 중간엽 줄기세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0017] 또한 본 발명은 하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하여 정적 배양 대비하여 상기 줄기세포의 BSP, OPN, RUNX2 및 ALP 유전자의 mRNA 발현 수준을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 메타아크릴레이트된 젤라틴(GelMA)-셀룰로오스 나노결정(CNC) 하이드로겔(GelMA)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또한 본 발명은 하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하여 상기 줄기세포의 IGFBP-2 사이토카인 분비를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 메타아크릴레이트된 젤라틴(GelMA)-셀룰로오스 나노결정(CNC) 하이드로겔(GelMA)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 또한 본 발명은 하이드로겔 상에 줄기 세포를 시딩하고 배양하는 과정에서 맥동압력 자극을 가하여 상기 줄기세포의 CTNNB1, CTNNBIP1 및 CTHRC1 유전자를 상향 조절하고, FZD1, FERMT2 및 LGR4 유전자를 하향조절하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔은 메타아크릴레이트된 젤라틴(GelMA)-셀룰로오스 나노결정(CNC) 하이드로겔(GelMA)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 맥동압력 자극은 5 내지 20kPa인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0028] 본 발명에서 본 발명자들은 매우 부드럽고 탄성이 있는 하이드로겔(0.07 ± 0.00049 Pa) 미세 환경에서 hBMSC에서 5-20 kPa의 박동 압력 자극(PPS)을 위해 맞춤형으로 설계된 생물 반응기를 개발했다.
- [0029] 본 발명자들은 골수 내부에서 생성된 골수압과 유사한 PPS가 연질 매트릭스에서 골형성 분화를 위해 hBMSCs mechanotransduction을 조작할 수 있다고 제안했다(도 1). 본 발명자들은 hBMSCs 기계적 자극을 위한 플랫폼으로 GelMA-셀룰로오스 나노결정(CNC) 하이드로겔(GelMA)을 사용했다. CNC는 종종 GelMA 기반 바이오잉크의 기계적 특성을 개선하기 위한 나노충전제로 사용된다. 본 발명자들은 생체 적합성 평가, 스트레스 유발 산화 손상, 광물화, 세포 접착, 세포 골격 방향, 유전자 및 단백질 발현, 사이토카인 및 골형성 분화와 관련된 케모카인 방출을 포함하여 세포 및 기능 수준에서 세포 매트릭스 상호 작용을 특성화했다.
- [0030] 본 발명자들은 RNA 시퀀싱 분석을 통해 전사체 변화와 데이터를 추가로 연관시켰다. 본 발명의 데이터는 0.07 ± 0.00049 Pa만큼 낮은 계수를 가진 부드럽고 유연한 하이드로겔이 5-20 kPa PPS에서 골형성 분화를 촉진할 수 있음을 시사한다. 본 발명자들은 이러한 사실이 하이드로겔 기반 골수 이식과 같은 임상 설정에서 뼈 재생을 도울 수 있을 것으로 기대한다. 또한 혁신적인 의료기기의 제작을 촉진할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 본 발명자들은 맞춤형 생물 반응기를 사용하여 7일 동안 5-20kPa의 박동성 압력 자극(pulsatile pressure stimulation;PPS)을 통해 믿을 수 없을 정도로 부드러운 3차원(3D) 하이드로겔(0.07 ± 0.00049 Pa)에서 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포(hBMSC)의 초기 골 형성을 달성했다. PPS는 기계적 전달 및 액틴 및 팽실린 분포, 생리학적 ROS 생성 금지, 칼슘 항상성, 골형성 마커 유전자 발현 증가, 골 특이적 사이토카인 및 케모카인 분비를 포함한 여러 세포 과정을 조절하는 것으로 나타났다.

[0032] 본 발명자들은 RNA 시퀀싱을 통해 골 형성에 관한 전사체 변화를 더 신중하게 분석했다. 종합하면, 본 발명은 막동성 기계적 자극을 기반으로 소프트 하이드로겔에서 골형성 분화를 얻는 새로운 방법을 확립했다.

[0034] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0035] 하이드로겔의 물리화학적 특성화

[0036] Matrigel®과 같은 단백질 기반 하이드로겔은 우수한 생체 적합성과 생체 활성 특성으로 인해 조직 공학 응용 분야에서 세포와 기질 유사체로 상업적으로 사용된다. GelMA는 골형성 분화를 포함한 바이오 응용 분야에서 Matrigel®의 잠재적인 대안이다. GelMA는 젤라틴과 메타크릴산 무수물(MAA)을 사용하여 합성되며 메타크릴화 정도(DM)를 조정하여 기계적 특성, 생체 적합성 및 세포 접착을 포함한 구조물의 생생리화학적 특성에 영향을 줄 수 있다. 더욱이 GelMA는 3D 프린팅을 위한 우수한 후보이다. 따라서 본 발명자들은 3D 인쇄 구성의 제작을 위해 GelMA를 선택했다. 본 발명자들은 젤라틴의 1차 아민기를 메타크릴산 무수물로 관능화하여 광가교성 GelMA를 합성하고, DM과 함께 합성의 성공을 NMR 분광기를 사용하여 결정했다. 순수한 젤라틴과 GelMA의 ^1H NMR 스펙트럼은 도 7에 나와 있다. 젤라틴의 특징적인 피크는 두 샘플에서 모두 관찰되었다. 7.1-7.4 ppm에서 관찰된 proton 피크는 페닐알라닌의 존재를 나타내고 2.8-3.0 ppm의 피크는 라이신 메틸렌으로 인해 나타난다. 또한 5.4 및 5.6ppm의 새로운 피크는 메타크릴레이트 그룹이 젤라틴에 성공적으로 결합되었음을 나타낸다. GelMA의 DM은 GelMA의 라이신 메틸렌 신호(2.8-3.0 ppm)와 변형되지 않은 젤라틴의 페닐알라닌 신호(7.1-7.4 ppm)의 통합 면적의 비율에 의해 결정된 바와 같이 $71.44 \pm 0.32\%$ 로 계산되었다.

[0037] 본 발명은 hBMSC 분화에 대한 기계적 자극의 효과를 평가하는 것을 목표로 했기 때문에 다음으로 셀룰로오스 나노결정(CNC)을 통합하여 기계적으로 더 안정적인 GelMA-CNC(CeIMA) 하이드로겔을 개발했다.

[0038] ATR-FTIR 분석을 수행하여 제작된 GelMA 및 CeIMA 하이드로겔의 화학 조성을 특성화했다(도 8). GelMA의 FT-IR 스펙트럼에서 아미드(II)의 N-H 스트레치를 나타내는 약 3292 cm^{-1} 및 C-H 스트레치에 해당하는 $\sim 2936\text{ cm}^{-1}$ 에서 특징적인 피크가 관찰되었다. 또한 ~ 1631 , 1531 및 1235 cm^{-1} 의 피크는 각각 아미드 기의 C=O 신축 진동, 아미드(II)의 N-H 굽힘 진동 및 아미드(III)의 N-H 굽힘을 확인했다. 준비된 CNC의 FTIR 스펙트럼은 3330 cm^{-1} (-OH 영역), 2898 cm^{-1} (CH 신축 진동), 1427 cm^{-1} (대칭 굽힘) 및 1314 cm^{-1} (C₆에서 CH₂ 웨킹)에서 피크를 나타내었다. 1160 , 1104 및 1053 cm^{-1} 의 피크는 CNC 준비 중 황산 가수분해로 인해 형성된 황산 에스테르 결합에 해당한다. CeIMA 하이드로겔의 경우 ~ 3319 , 2122 및 1636 cm^{-1} 에서 피크가 나타났으며, 이는 각각 카르복실산의 OH 스트레칭, 아지드의 약한 C≡C/N=C=N 카르보디미드의 스트레칭/강한 N=N=N 스트레칭 및 C=C 스트레칭의 존재를 나타낸다. 피크의 모양은 GelMA와 CNC 사이의 화학적 상호작용을 나타낸다.

[0039] 잉크의 점탄성 특성은 배양 조건에서 PPS 하에서 인쇄 거동과 후속 물리화학적 특성을 크게 결정한다. 따라서 점탄성 특성의 추정이 중요하다. 가교된 바이오잉크의 점탄성 특성은 RT에서 $0.1 \sim 100\text{ rad/s}$ 의 각 주파수(ω) 범위에서 회전 레오미터를 사용하여 결정되었다. 측정된 ω 범위에서 점도의 변화와 함께 바이오잉크의 저장 탄성률(G')과 손실 탄성률(G'')의 변화는 도 2(a)에 나와 있다. 일반적으로 점탄성 재료의 유변학적 특성은 임계 변형 수준까지 변형과 무관하며, 그 이상에서는 저장 탄성률이 감소하여 비선형 곡선이 생성된다. 본 발명자들은 임계 변형률(γ_c)이 GelMA 하이드로겔의 경우 21.17% 임을 관찰했으며, 제작된 겔에 대한 변형률 스윙에서 관찰된 바와 같이 CeIMA 하이드로겔의 경우 38.24% 로 증가했다. 제작된 겔의 상응하는 $\tan \delta$ 값은 GelMA 및 CeIMA에 대해 각각 27.60 및 6.546 이었다. 다음으로 5% 변형률에서 주파수 스윙을 사용하여 입자 상호 작용을 특성화했다. 탄성 계수(G')는 측정된 영역에서 CeIMA 하이드로겔의 주파수와 거의 무관한 반면 G'' 의 감소는 GelMA 하이드로겔에서 관찰되었다. 이것은 CeIMA 하이드로겔이 GelMA 대응 물보다 기계적으로 더 강력하다는 것을 나타낸다. 점도 대 전단 속도는 CeIMA 하이드로겔의 전단 박화 거동이 GelMA의 거동보다 컸음을 분명히 보여 준다. 다음으로 차등 전단 속도에 노출되었을 때 점도 회복 정도를 분석했다. 본 발명자들은 GelMA 하이드로겔의 경우 91.37% 의 회수율을 발견했으며 CeIMA 하이드로겔의 경우 91.37% 였다. 본 발명의 데이터는 GelMA 하이드로겔보다 CeIMA의 기계적 강도가 향상되었음을 분명히 시사한다.

[0041] GelMA 및 CeIMA 하이드로겔의 디지털 광 처리

- [0042] 다음으로 DLP 인쇄 기술을 사용하여 GelMA 및 CelMA 잉크를 3D 인쇄했다. 제작된 하이드로겔의 DLP 인쇄 공정의 개략도는 도 2b에 나와 있다. 도 2b(상단 패널) 슬라이스 CAD(Computer-Aided Design) 모델에 표시된 것처럼 각각 0.8mm의 내부 필라멘트 3개가 있는 $10 \times 10 \times 5\text{mm}$ 입방체 구조를 인쇄했다. GelMA 및 CelMA 바이오잉크에 대해 25개의 레이어가 인쇄되었다. 405 nm 자외선 광원을 사용하여 빛에 노출되면 각 층의 광중합을 통해 생체 재료 잉크를 고형화한다. 다른 인쇄 매개변수를 일정하게 유지하면서 원하는 구조를 인쇄하기 위해 레이어 노출 시간을 조정했다. 인쇄된 스캐폴드의 표면 형태는 도 2c의 FE-SEM 이미지에서 관찰된다. 본 발명자들은 GelMA와 CelMA 스캐폴드에서 비슷한 표면 다공성을 관찰했다. 또한 두 스캐폴드에서 주요 요소의 균일한 분포를 확인했다(도 2c 및 도 9).
- [0043] 도 2e와 같이 제작된 하이드로겔의 팽윤 특성을 추가로 조사했다. CNC의 추가는 PBS에 담그고 1시간 이내에 스캐폴드의 즉각적인 팽윤 거동을 제어했으며 PBS에 담긴 12시간 후에도 추세가 계속되어 CNC가 제작된 하이드로겔에서 물리적 가교제임을 나타낸다. GelMA와 CNC의 밀접하게 연결된 네트워크는 하이드로겔의 팽창을 제한할 수 있다. 본 발명의 팽창 데이터는 CelMA의 유연학적 거동에 따른다. 결과에 따라 추가 특성화를 위해 CelMA 하이드로겔을 선택했다. CelMA의 기계적 특성은 팽윤 전후에 평가되었다. 본 발명자들은 PPS 연구를 위해 CelMA를 부드럽고 내구성 있는 하이드로겔로 만드는 도 2d와 같이 팽창 후 최대 7일 동안 CelMA 하이드로겔의 기계적 안정성의 공정한 유지를 관찰했다.
- [0045] 3D 배양에 대한 박동 압력 자극(Pulsatile pressure stimulation)
- [0046] 맞춤형 박동 압력 생물 반응기 시스템은 필요한 압력 조건을 생성하기 위한 진공 펌프 이중 실린더(35-40 L/min 유량, 진공도 650 mmHg), 실시간 압력 모니터링 및 표시 장치, 튜브, 단방향 밸브, $0.25\mu\text{m}$ 공기 필터, 압력 자극 이벤트당 하나의 표준 조직 배양 플레이트를 수용할 수 있는 직사각형 금속 바이오 챔버($160 \times 120 \times 55\text{mm}$), 고정된 패스너 및 실리콘 가스켓 실린드로 구성된다. 마이크로프로세서 제어 액추에이터 및 압력 밸브를 사용하여 5-20kPa 및 20-30kPa의 PPS를 제어했다(도 10). 바이오 챔버는 하부 챔버 상단에 상부 덮개를 포함한다. 압력 펌프는 인큐베이터에서 가습된 멸균 공기를 받아 바이오 챔버 내부에 원하는 박동 압력을 생성했다. 압력은 튜브 시스템을 통해 바이오 챔버 안팎으로 단방향 흐름으로 조절되었다. 여과된 공기는 입구를 통해 챔버로 들어가고 출구를 통해 빠져나가 세포-하이드로겔 구조를 포함하는 배지의 상단에 균일하게 분포된 압력을 가한다. 따라서, 원하는 진폭의 맥동 압력이 구조물에 전달되었다. 박동 압력은 배양된 hBMSC에 24시간마다 20분 동안 적용되었고 실시간 압력 신호는 도 3(a, b)와 같이 압력 압력계 작동 소프트웨어를 사용하여 기록되었다.
- [0048] PPMS에 대한 생체 적합성 평가
- [0049] 본 발명자들은 5-20kPa 및 20-30kPa에서 5일 동안 PPS에서 3D 인쇄된 GelMA 및 CelMA 스캐폴드에서 hBMSC의 생체 적합성을 평가했다. PPS 없이 제작된 스캐폴드에서 배양된 hBMSC가 대조군으로 사용되었다. 본 발명자들은 PPS가 있거나 없는 스캐폴드가 있는 경우 배양된 세포의 생존력이 향상되는 것을 관찰했다. 그러나 2D 및 3D 배양 조건 모두에서 PPS에 노출되면 24시간의 자극 후 세포 생존율이 눈에 띄게 증가했다(도 2c). 기계적 자극에 노출된 GelMA 및 CelMA 하이드로겔 중에서 본 발명자들은 두 하이드로겔 구성체에 대한 hBMSC 생존율에서 유사한 경향을 관찰했다. 본 발명의 데이터를 기반으로, 본 발명자들은 배양 3일 후 기계적 자극이 없는 3D 스캐폴드에 대한 살아있는/죽은 분석을 통해 hBMSC 생존력을 추가로 평가했다. 두 스캐폴드는 모두 생체 적합성이 높았으며 죽은 세포가 보이지 않았다(도 11). 세포 생존율이 모든 실험 조건에서 hBMSC에서 유사한 경향을 나타내므로 본 발명자들은 CelMA 하이드로겔에만 관련된 골 형성 분화 및 초기 전사체 변화를 분석하기 위한 압력 조건으로 5-20kPa PPS를 선택했다.
- [0050] 세포에 스트레스를 가하면 종종 산화 손상을 유발하고 세포 분화를 억제할 수 있다. 따라서 본 발명자들은 먼저 PPS에서 hBMSC의 산화 손상을 연구하기로 결정했다. 이를 위해 도 3d와 같이 H2DCF-DA 염색에 의해 H_2O_2 유도 산화 스트레스를 수행했다. ROS 생산의 기본 수준은 생리학적 ROS 생산을 나타내는 음성 대조군 세트(w/o pressure, w/o H_2O_2)에서 관찰되었다. 정규화된 강도에서 확인된 바와 같이 H_2O_2 스트레스에 대한 음성 대조군 세트에서도 유사한 ROS 생성이 관찰되었다. 예상외로 H_2O_2 의 존재 여부에 관계없이 PPS 처리된 세포에서 ROS 생성이 급격히 감소했다.

- [0051] 다음으로, 본 발명자들은 CelMA 하이드로겔에 대한 PPS 매개 세포 운명 커미트먼트의 메커니즘을 조사하기 위해 분자 마커 면역염색을 사용하여 액틴 세포골격 및 팽실린 분포를 연구했다. 본 발명자들은 PPS가 없는 hBMSC에서 잘 확산된 팽실린 분포를 관찰했다. Paxillin은 PPS에 대한 유착에서 강하게 발현되었다. 또한, 본 발명자들은 기계적으로 자극된 세포의 핵 주변에서 점상 팽실린 분포를 관찰했다(도 3e). 팽실린 분포 패턴은 PPS가 성숙한 초점 유착의 형성을 촉진함을 나타낸다. 액틴 분포는 PPS 세트에서 잘 조직화되는 것으로 관찰되었다. 본 발명자들은 공초점 이미징 시스템을 사용하여 액틴 세포골격 단백질의 공간 분포를 추가로 분석했다(도 3f). PPS로 자극된 세포에서 액틴 필라멘트의 평균 퍼짐 면적은 처리되지 않은 세포와 관련하여 크게 달랐으며, 이는 PPS의 적용이 3일 동안 액틴 신호의 증가를 초래했음을 나타낸다. 더욱이, 대부분의 세포는 기계적으로 스트레스를 받은 세포에서 스캐폴드 바닥을 따라 대각선으로 정렬되었다. hBMSC w/o PPS는 무작위 분포를 보였다. 본 발명의 데이터는 PPS의 적용이 하이드로겔 표면 위에 액틴 세포골격의 단방향 정렬을 선호함을 강력하게 시사한다. 또한, 대조군의 핵은 구형으로 관찰된 반면, PPS에 노출된 세포는 종종 세포 주변부로 밀리는 타원형 핵 형태를 보였다. 이러한 결과들은 PPS에 노출된 세포가 처리되지 않은 세포에 비해 더 효율적인 기계적 형질도입을 보여주었다는 것을 나타낸다.
- [0053] PPMS는 hBMSC의 골 형성 분화를 가속화한다
- [0054] hBMSC의 골형성 분화에서 PPS의 역할을 조사하기 위해 본 발명자들은 7일 동안 PPS를 w/o로 하는 CelMA 하이드로겔에서 배양된 세포를 처리했다. 원하는 처리 후 ARS 염색 절차를 사용하여 위에서 언급한 조건에서 hBMSC의 초기 광물화 가능성을 결정했다. 도 3g는 골형성 분화 배지에서 7일 동안 hBMSC로 배양된 CelMA 하이드로겔의 디지털 사진을 보여준다. 정상적인 대기압 조건에서 하이드로겔에서 광물 침착의 가벼운 분산이 관찰되었다. PPS 하에서, 처리 7일 이내에 세포에서 현저하게 증가된 미네랄 침착이 기록되었다. 광물화의 정량적 지표로서 본 발명자들은 도 3h에 기록된 바와 같이 하이드로겔의 미네랄 함량을 정량화했다. PPS 처리된 세포에서 광물화의 증가가 관찰되었으며, 이는 PPS에서 더 유의한 광물화를 확인시켜주었다. hBMSCs w/o PPMS에서 Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 평가하여 hBMSCs의 초기 골형성을 추가로 확인했다.
- [0055] 도 3g(하단 패널)는 하이드로겔의 디지털 이미지와 ALP 발현을 시각화하기 위한 해당 광학 현미경 이미지를 보여준다. 본 발명자들은 기계적 자극 시 ALP의 명확한 증가된 발현을 관찰했다. 증가된 발현을 정량적으로 비교하기 위해 배양된 수프에서 ALP의 양을 정량화했다. 본 발명자들은 배양 수프 500 μ L당 약 0.5mU의 ALP 분비 증가를 관찰했다(도 12).
- [0057] 조골세포 특이적 유전자 및 단백질 발현
- [0058] 계보 사양을 확인하기 위해 다음으로 qRT-PCR 분석을 수행했다. 도 3i와 같이 RUNX2, ALP, Col1, BSP, OPN, OSX, RANKL 및 NF- κ B를 포함한 8개의 골형성 특이적 유전자 마커를 사용했다. 본 발명자들은 7일째에 3D 배양 조건에서 w/o PPS 하에서 세포에서 초기 및 후기 골형성 마커의 유전자 발현을 결정했다. RUNX2 및 ALP의 상승된 발현 수준은 정적 및 PPS 배양 조건에서 hBMSC의 골형성 분화의 시작을 나타냈다. 그러나 초기 단계(ALP, RUNX2 및 Col1)와 후기 단계 마커(OSX, OPN, BSP) 모두 PPS에 의해 유의한 영향을 받았다. PPS에서 배양된 세포는 7일째에 RUNX2(~2.2배) 및 ALP(~15배)의 mRNA 수준이 증가했으며, 이는 정적 샘플보다 유의하게 더 높았다(**p < 0.001). 그러나 Col1의 발현은 PPS에서 감소했다(~4배).
- [0059] 유사하게, 정적 조건과 비교할 때 기계적 자극 하에서 BSP(~90배), OPN(~40배) 및 OSX(~0.5배)의 발현이 극적으로 증가하는 것을 관찰했다(**p < 0.001 및 **p < 0.01). PPS에 따른 조골세포 특이적 유전자 발현의 급격한 변화를 바탕으로 골형성 분화에 중요한 RANKL의 발현을 추가로 평가하였다. 본 발명자들은 PPS에 노출된 세포에서 RANKL의 발현에서 ~28배 증가(***p < 0.001)를 관찰했으며, 이는 PPS에서 더 실질적인 혈통 약속을 강력하게 나타낸다. 세포의 NF- κ B 발현은 압력 자극 시 ~10배(*p < 0.05)까지 동일하게 증가했다. 본 발명자들은 선택된 단백질의 발현을 평가하여 위치를 확인함으로써 유전자 발현 결과를 추가로 검증했다. 본 발명자들은 두 조건에서 7일 간의 세포 배양 후 RUNX2 및 ALP 단백질 국소화를 확인했다. 본 발명의 면역 염색 데이터는 세포체 전체에서 골 형성 단백질의 발현을 확인하여 두 배양 조건에서 hBMSC의 정상적인 생리 기능을 나타낸다.
- [0060] 또한, 본 발명자들은 사이토카인 및 케모카인의 검출을 위해 hBMSC의 secretome을 테스트했다. 본 발명자들은 TGF 베타-1, TGF 베타-2, OPG(TNFRSF11), IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IP-10(CXCL 10), LIF, NT-3, NAP-2, MIP-1 베타(CCL4), IL-6, IL-8, IL-10, RANTES(CCL5) 및 OSM를 포함한 여러 사이토카인의 분비 증가를 관찰했

다. 대조적으로, TIMP1, TIMP2에 대해서는 감소된 분비가 관찰되었다. TGF 베타-2(~0.8-배)에서 가장 적은 증가가 관찰된 반면, IGFBP-2(~2.8-배)의 분비에서 가장 높은 증가가 관찰되었다.

[0061] PPS에 따른 세포의 분비 패턴은 골형성 유지 사이토카인(TGF 베타-2, OPG(TNFRSF11), IGFBP-3, IP-10(CXCL10), LIF, IL-10)으로서 골형성 촉진 사이토카인(TGF 베타-1, IGFBP-2, IGFBP-4, NT-3, NAP-2, MIP-1 베타 또는 CCL4, IL -6, IL-8, RANTES(CCL5), OSM)의 발현 사이에 균형을 강하게 시사한다. 이러한 결과들은 CelMA 하이드로겔에 대한 PPS가 7일 이내에 골형성 분화를 촉진할 수 있음을 시사한다. 이러한 결과를 바탕으로 본 발명자들은 RNA-seq 분석을 사용하여 PPMS 동안 초기 전사체 변화의 연속적인 평가를 수행하기로 결정했다.

[0063] CelMA 하이드로겔의 PPS에서 DEG 비교

[0064] RNA-seq 데이터는 25,737개의 전사체가 대조군 조건과 관련된 발현 수준에서 2배 변화(FC)로 검출되었음을 보여주었다. 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 기반으로, 가장 하향 조절되고 상향 조절된 유전자가 데이터 분석을 위해 선택되었다. DEG는 계층적 클러스터링을 거쳐 히트 맵으로 표시되었다.

[0065] 그런 다음 hBMSC의 골 형성 분화에 관여하는 유전자의 발현을 분석했다(도 4a-i). 유전자 발현의 산점도는 이등 분선(도 4b, c)에서 더 멀리 선으로 표시된 점으로 표시되는 다양한 배양 조건에서 발현 패턴의 급격한 변화를 보여준다. 골형성 분화와 관련된 54개의 유전자가 차등적으로 발현되는 것으로 관찰되었다. 단순화를 위해 여기에서 hBMSC가 조골 세포에 관여하고 초기 골 형성에 관여하는 몇 가지 유전자에 대해 논의했다. RunX2와 BMP6은 MSC가 골전구 세포에 결합하는 표지 역할을 한다. 본 발명자들은 PPS 시 세포에서 RunX2(~7-배) 및 BMP6(~1.2-배)의 발현이 급격히 증가하는 것을 관찰했으며, 이는 부드러운 하이드로겔에 대한 기계적 자극이 hBMSC의 골전구세포로의 분화를 가속화할 수 있음을 분명히 나타낸다. 본 발명자들은 알칼리성 인산 가수 분해 효소 (ALP), 콜라겐 I A1 (Col1A1), Osterix (Osx 또는 Sp7) 및 Thrombopoietin (Tpo)을 포함한 몇 가지 골전구 마커에 대한 DEG를 추가로 평가했다. 본 발명자들은 CelMA에서 기계적으로 자극된 세포에서 Col1A1의 ~0.3배 더 높은 발현을 관찰했다. 압력 자극 없이 CelMA에서 배양된 세포에서 발현이 4배 하향조절되었다. 놀랍게도, ALP, Sp7 및 Tpo에 대해 차등 발현이 관찰되지 않았다. 표현의 주요 차이점 중 하나는 JunD에 대한 것이었다. JunD의 결손은 Fra1, Fra2, c-Jun의 발현을 증가시켜 골질량을 증가시키는 것으로 알려져 있는데, 이는 JunD가 골형성의 음성 조절자임을 시사한다. 본 발명의 데이터는 골형성 배지의 존재 하에서 하향조절된 JunD 발현을 보여주었으며, JunD 발현은 3D 배양 조건에서 더욱 하향조절되었다. 그러나, 유전자 발현은 기계적 자극 시 0.54배 하향 조절된 반면, 하향 조절은 압력 자극 없이 ~1.28배였다. 이것은 압력 자극이 CelMA 스캐폴드에서 배양된 세포에서 JunD의 발현을 약간 증가시켰음을 나타낸다(도 4a, d). 클러스터링 패턴을 결정하기 위해 모든 DEG의 문자열 분석이 수행되었다. 본 발명자들은 골 형성 분화에 적극적으로 관여하는 최소 10개의 클러스터를 발견했으며, 이는 골 형성 분화에 대한 hBMSC의 강력한 생리학적 반응을 나타낸다(도 4e).

[0066] 그런 다음 뼈 광물화 과정과 관련된 DEG를 분석했다. 골 광물화에 관여하는 총 32개의 필수 유전자가 차등적으로 발현되었다. 흥미롭게도, 대부분의 유전자는 대조군에 비해 압력 자극 시 CelMA 그룹에서 과발현되었다. 증가된 발현은 Col1A2 및 BMP2에 대해 관찰되었다. 칼슘 항상성에 관련된 유전자의 발현은 도 4f, g에 나와 있다. 유전자는 칼슘 항상성의 기능적 유사성을 기반으로 9개 그룹으로 분류되었다. DEG를 포함하는 단백질의 클러스터 분석은 칼슘 항상성의 기능적 유사성을 기반으로 하는 9개의 유전자 클러스터를 밝혀냈다(도 4h 및 13). RNA-seq 데이터는 7일의 자극 후 광물화를 위한 ARS 염색법을 이용한 시험관 내 광물화 데이터로 구성되었다. 본 발명의 결과는 부드러운 하이드로겔의 기계적 자극이 5-7일 이내에 hBMSC의 골형성 분화를 자극할 수 있음을 시사한다. 본 발명자들은 골 형성 분화와 관련된 여러 신호 전달 경로에서 유전자 발현 변화를 확인했다(도 4i). 단순성을 위해 본 발명자들은 골 형성 분화 동안 신호 전달 경로에서 중요한 역할을 하는 DEG를 선택했다. DEG는 골형성과 관련된 Wnt, MAPK, BMP, Notch, ERK 1/2 및 Ca²⁺ 매개 신호 경로에서 관찰되었다. Wnt 경로와 관련된 유전자 중에서 8개의 DEG가 관찰되었다. CTNNB1(~6배), CTNNBIP1(~6배) 및 CTHRC1(~5배)의 세 가지 중요한 유전자가 상향 조절되었다. 동시에, 하향조절된 유전자에는 FZD1(~5배), FERMT2(~3배) 및 LGR4(~7배)가 포함되었다. DDIT3 발현에서 ~7배 상향 조절이 관찰되었고 WNT5A 발현에서 ~5배 하향 조절이 관찰되었다. 둘 다 칼슘 항상성에 적극적으로 관여한다. MAPK 신호 전달 경로에 관여하는 유전자에 대한 DEG 분석은 9개의 DEG의 존재를 밝혀냈고, 그 중 4개는 조골세포 분화(SMAD4, MAPK14, MEF2C 및 PTK2B)와 연관되었고, 하나는 골 광물화(TGFB1)에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 4개의 유전자가 칼슘 항상성에 관여했다(YWHAE, TGFB1, WNT5A 및 PTK2B). 상향 조절된 유전자에는 SMAD4(~7배), MEF2C(~6배), YWHAE(~1배) 및 TGFB1(~4배)이 포함되었다. 반면에 MAPK14와 PTK2B는 각각 ~7배 하향조절되었다. BMP 관련 조골세포 분화 과정에 관여하는 7개의 유전

자(SMAD4, BMPR2, BMP6, RunX2, BMPR2, BMP6 및 PPARG)가 관찰되었다. 뼈 광물화에 관여하는 3개의 유전자(TGFB1, BMPR2, BMP6)와 칼슘 항상성에 관여하는 1개의 유전자(TGFB1)도 관찰되었다. 3개의 DEG가 Notch 신호 전달 경로를 통해 골형성 분화(CDK6) 및 뼈 광물화(TGFB1 및 APP)에 관여하는 것으로 밝혀졌다. ERK 1/2를 통한 조골세포 분화에 관여하는 SMAD 4는 상향조절되는 것으로 밝혀졌다. 3개의 유전자가 골형성 분화(PPP3CA) 및 뼈 광물화(ZMPSTE24 및 EIF2AK3)에서 Ca 신호전달과 연관되었다.

[0067] 본 발명자들은 이온 채널 활동의 발현 프로파일에 초점을 맞추었다(도 5a, b). 조골세포와 골전구세포는 Na⁺, L형 Ca²⁺, 부피 민감성 Cl⁻ 및 기계적 민감성 양이온 채널을 비롯한 수많은 이온 채널을 보유한다. 멤브레인 스트레치는 Piezo 1, Piezo 2 및 KCNK2를 비롯한 주요 이온 채널의 발현을 활성화하는 것으로 알려져 있다. Piezo 1, Piezo 2, KCNK2, TRPA, LRRC8A 및 TTYH3의 6가지 주요 이온 채널을 분석했다. 대부분의 이온 채널의 활동은 압력 자극 없이 3D 배양에서 하향 조절되었다. 그러나 압력을 가하면 2D 배양 조건에서 관찰된 것과 유사한 이온 채널 발현이 복원되었다. Piezo 1은 MSC가 조골세포 전구체로 분화되는 초기에 발현되는 반면, Piezo 2는 일반적으로 파골세포 분화 동안 유도된다. 본 발명자들은 OM의 2D 표면에서 배양된 hBMSC가 Piezo 1과 Piezo 2 모두에서 더 높은 발현을 보였으며 그 중 Piezo 2가 가장 높은 발현을 보였다는 것을 발견했다. 압력 자극 없이 CelMA 스캐폴드에서 배양된 hBMSC는 PIEZO1 및 PIEZO2의 발현이 각각 ~1.5배 및 ~0.8배까지 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 그러나, 맥동 압력의 적용은 두 유전자의 발현을 2D-OM 배양 조건에서 관찰된 것과 더 가깝게 회복시켰으며, 이는 압력에 의한 Piezo 발현의 활성화를 나타낸다. 본 발명자들은 감소된 발현이 골 형성 분화의 부정적인 조절을 나타낸다고 가정했다. 그러나 Piezo 1의 하향 조절은 이전에 줄기 세포와 전구 세포의 골 형성 분화에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 류신이 풍부한 반복 단백질 8A(LRRC8A)의 발현은 압력 자극 하에서 유의하게 증가했다. LRRC8A는 저장성 유발 요오드 유입에 필수적인 부피 조절 음이온 채널(VRAC)이다. 본 발명자들은 맥동 압력의 적용이 어떻게든 세포 부피의 변경에 도전할 것이라고 생각한다.

[0068] 본 발명자들은 또한 칼슘 활성화 칼륨 채널 소단위 베타-3(KCNMB3)의 향상된 발현을 관찰했다. KCNMB3 발현은 조골세포 분화와 관련이 있다. 압력 유발 KCNMB3 발현의 증가는 기계적 자극에 대한 Ca²⁺ 의존적 신호전달의 관여를 나타낸다. 수동적 막형단 칼륨 수송을 담당하는 칼륨 채널 서브패밀리 K 구성원 2(KCNK2)는 또 다른 기계적 감수성 이온 채널이다. 본 발명자들은 CelMA 스캐폴드 w/wo 맥동 압력 자극이 있는 상태에서 이 이온 채널의 하향 조절된 발현을 관찰했다. 따라서, 본 발명은 박동 압력 기계적 자극이 K⁺ 채널의 발현을 감소시키면서 Ca²⁺ 이온 채널의 더 높은 발현을 유도한다는 것을 밝혀냈다.

[0069] 세포 부착과 관련된 전사체 변화를 분석했다. ILK(Integrin-linked kinase)와 같은 여러 유전자는 뼈 형성 동안 ECM에서 액틴 세포골격으로 정보 전달을 매개한다. 본 발명자들은 처리 그룹에서 ILK 발현의 ~1.4배 증가를 관찰했다. PPS에서 상향 조절된 다른 주요 유전자에는 TNS2, ACTN4, PXN, ITGBL1, ITGA3, VCL, ITGB5, ITGA4, TNS3 및 TLN2가 포함된다.

[0070] 이에 비해 PPS에서 하향조절된 유전자에는 ITGB1BP1, ITGA5, ITGB1, TLN1 및 ITGAS가 포함되었다. 국소 접착에 관여하는 유전자 중 PPS의 적용은 압력 자극 없이 CelMA 골격에서 하향 조절되었던 대부분의 유전자의 발현을 회복시켰다. 액틴 4, 팽질린 및 빈쿨린의 발현은 PPS에서 CelMA에서 배양된 hBMSC에서 각각 ~2배, 0.5배 및 3배 향상되었다. 국소 접착에 관여하는 DEG는 기계적 자극 하에서 세포의 국소 접착에서 명백한 개선을 보여주었다. ECM 형성에 관여하는 DEG에는 WNT5B, TGFB1/1, WNT5A, CTHRC1, GPC4(Wnt 경로), TGFB1, WNT5A(MAPK 경로), TGFB3, GDF 15 및 TGFB1(BMP 경로)이 포함된다.

[0071] Wnt 경로를 통한 국소 접착에 관여하는 DEG에는 CDC42, FERMT2, TGFB1/1, FZD2, CTNNB1, RHOA, DAB2, RAC1 및 FZD1이 포함된다. 또한 BMP 신호 전달과 관련된 DEG에는 MAPK3이 포함되었다. MAPK 신호전달 경로는 PAK1, KRAS, PPP1CC, HACD3, MAP2K1, MAPK3, YWHAZ, MAP2K2, NPHS1, PPP1CB, MAP4K4, MAPK1, EGFR, PTK2B 및 YWHAZ의 차등 발현을 보였다. ERK 1/2와 관련된 DEG에는 MAP2K1 및 MAPK1이 포함되고 ERK 1/3 및 ERK 1/4와 관련된 DEG에는 각각 YWHAZ 및 MAPK3 및 MAP2K2가 포함된다. Wnt 및 MAPK 신호 전달 경로와 관련된 DEG 목록은 (표 1 및 2)에 나열되어 있다.

[0072] PPMS에 의해 변경된 세포 과정을 더 조사하기 위해 본 발명자들은 ROS, ER 스트레스 및 미토콘드리아 대사 과정에 관여하는 DEG를 조사했다. 대부분의 유전자는 압력 자극 배양 조건에서 하향 조절되어 기계적 자극이 세포 스트레스를 방지함을 나타낸다. Superoxide dismutase 2(SOD2)는 PPMS 조건에서 ~1배 상향 조절되었다. SOD2는 과산화물을 산소와 과산화수소로 전환하는 데 중요한 효소이다. SOD2의 증가된 발현은 기계적 자극이 더 높은 세포 대사를 유발할 수 있음을 나타낼 수 있다. 미토콘드리아 산화환원 균형에 관여하는 NNT(Nicotinamide nucleotide transhydrogenase)는 ~2배 상향 조절되어 분화 과정에서 더 높은 대사 활성을 나타낸다(그림 S8).

ROS 대사 경로에 관여하는 DEG는 PPS 유도 항산화 변화를 확인하는 항산화 분석을 지원한다.

표 1

[0073]

Gene Symbol	Fold change	Description	Gene information (NCBI search)
CTNNBIP1	114.749	catenin beta interacting protein 1	CTNNBIP1
VANGL1	69.933	VANGL planar cell polarity protein 1	VANGL1
KLHL12	27.528	kelch like family member 12	KLHL12
CCNY	0.027	cyclin Y	CCNY
DKK1	0.004	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	DKK1
FAM53B	85.206	family with sequence similarity 53 member B	FAM53B
CTR9	0.350	CTR9 homolog, Paf1 /RNA polymerase II complex component	CTR9
LGR4	0.007	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4	LGR4
DDB1	0.218	damage specific DNA binding protein 1	DDB1
MARK2	63.100	microtubule affinity regulating kinase 2	MARK2
CCND1	2.496	cyclin D1	CCND1
DDIT3	197.347	DNA damage inducible transcript 3	DDIT3
C12orf43	112.136	chromosome 12 open reading frame 43	C12orf43
CHD8	3.654	chromodomain helicase DNA binding protein 8	CHD8
FERMT2	0.172	fermitin family member 2	FERMT2
RTF1	0.009	RTF1 homolog, Paf1 /RNA polymerase II complex component	RTF1
LEO1	0.009	LEO1 homolog, Paf1 /RNA polymerase II complex component	LEO1
PYG01	55.262	pygopus family PHD finger 1	PYG01
CSNK1G1	169.613	casein kinase 1 gamma 1	CSNK1G1
BRD7	0.123	bromodomain containing 7	BRD7
CYLD	2.723	CYLD lysine 63 deubiquitinase	CYLD
AMFR	82.594	autocrine motility factor receptor	AMFR
CSNK2A2	41.596	casein kinase 2 alpha 2	CSNK2A2
NXN	2.274	nucleoredoxin	NXN
HIC1	0.006	hypermethylated in cancer 1	HIC1
TAX1BP3	0.130	Tax1 binding protein 3	TAX1BP3
DVL2	110.126	dishevelled segment polarity protein 2	DVL2
FZD2	71.540	frizzled class receptor 2	FZD2
SMURF2	88.422	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	SMURF2
STK11	0.011	serine /threonine kinase 11	STK11
CSNK1G2	0.068	casein kinase 1 gamma 2	CSNK1G2
PAF1	3.663	PAF1 homolog, Paf1 /RNA polymerase II complex component	PAF1
SDC1	0.007	syndecan 1	SDC1
STRN	97.465	striatin	STRN
CCDC88A	0.085	coiled-coil domain containing 88A	CCDC88A
FZD7	0.014	frizzled class receptor 7	FZD7
TMEM198	0.033	transmembrane protein 198	TMEM198
CUL3	133.640	cullin 3	CUL3
GID8	0.016	GID complex subunit 8 homolog	GID8
HMGXB4	2.218	HMG-box containing 4	HMGXB4
RAB5A	131.429	RAB5A, member RAS oncogene family	RAB5A
LRRFIP2	2.187	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 2	LRRFIP2

CTNNB1	111.935	catenin beta 1	CTNNB1
WNT5A	0.018	Wnt family member 5A	WNT5A
RYK	0.026	receptor-like tyrosine kinase	RYK
CSNK1A1	60.085	casein kinase 1 alpha 1	CSNK1A1
RNF146	195.940	ring finger protein 146	RNF146
FZD1	0.028	frizzled class receptor 1	FZD1
HBP1	46.821	HMG-box transcription factor 1	HBP1
CTHRC1	37.837	collagen triple helix repeat containing 1	CTHRC1
EXT1	118.969	exostosin glycosyltransferase 1	EXT1
RECK	41.596	reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs	RECK
INVS	63.903	inversin	INVS
DDX3X	0.018	DEAD-box helicase 3, X-linked	DDX3X
MED12	0.019	mediator complex subunit 12	MED12

[0074]

표 1은 C-OM + PS 처리된 hBMSC wrt C-OM - PS 배양 세포에서 Wnt 신호 전달 경로의 DEG 목록.

표 2

[0075]

Gene Symbol	Fold change	Description	Gene information (NCBI search)
MAP3K8	156.148	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8
MAP3K11	18.886	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	MAP3K11
PAK1	117.964	p21 (RAC1) activated kinase 1	PAK1
MAP3K12	0.026	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12	MAP3K12
DUSP6	102.289	dual specificity phosphatase 6	DUSP6
PPP1CC	169.814	protein phosphatase 1 catalytic subunit gamma	PPP1CC
TAOK3	0.019	TAO kinase 3	TAOK3
CAMKK2	0.142	calcium /calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	CAMKK2
MAP4K5	350.486	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	MAP4K5
ZFP36L1	0.358	ZFP36 ring finger protein-like 1	ZFP36L1
MAPK6	144.090	mitogen-activated protein kinase 6	MAPK6
HACD3	14.911	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	HACD3
MAP2K1	9.484	mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP2K1
MAP2K5	0.020	mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5
TAOK2	0.018	TAO kinase 2	TAOK2
MAPK3	8.101	mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3
GPS2	4.263	G protein pathway suppressor 2	GPS2
MAP2K4	4.197	mitogen-activated protein kinase kinase 4	MAP2K4
TAOK1	69.531	TAO kinase 1	TAOK1
MAP3K3	104.298	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	MAP3K3
GPS1	0.409	G protein pathway suppressor 1	GPS1
SMAD4	71.741	SMAD family member 4	SMAD4
CDC42EP5	0.025	CDC42 effector protein 5	CDC42EP5
PPP1CB	0.087	protein phosphatase 1 catalytic subunit beta	PPP1CB
MAP3K2	0.109	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	MAP3K2
CRKL	122.788	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like	CRKL
DUSP7	2.721	dual specificity phosphatase 7	DUSP7
WNT5A	0.018	Wnt family member 5A	WNT5A
MAP3K13	0.024	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	MAP3K13

RAPGEF2	0.008	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	RAPGEF2
MEF2C	57.271	myocyte enhancer factor 2C	MEF2C
RIPK1	19.891	receptor interacting serine /threonine kinase 1	RIPK1
MAPK14	0.015	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14
MAP3K7	149.918	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	MAP3K7
MAP3K4	0.009	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP3K4
EGFR	4.484	epidermal growth factor receptor	EGFR
PTK2B	0.011	protein tyrosine kinase 2 beta	PTK2B
PBK	0.302	PDZ binding kinase	PBK
FGFR1	0.041	fibroblast growth factor receptor 1	FGFR1
SETX	107.715	senataxin	SETX
ZDHC9	92.441	zinc finger DHHC-type containing 9	ZDHC9
IRAK1	0.283	interleukin 1 receptor associated kinase 1	IRAK1

[0077] 표 2는 C-OM + PS 처리된 hBMSC wrt C-OM - PS 배양 세포에서 MAPK 신호 전달 경로의 DEG 목록.

발명의 효과

[0079] 본 발명에서는 hBMSC의 골 형성 분화에 대한 단기 박동 압력 기계적 자극의 중요한 기여를 분석했다. 본 발명은 통제된 조건에서 맥동 압력을 생성하는 맞춤형으로 설계된 생물 반응기 시스템을 개발했고, 그 생물 반응기 시스템을 사용하여 최적화된 기계적 자극 하에서 골형성 분화 동안 hBMSC의 초기 전사체 변화에 대한 통찰력을 제공했다. 본 발명은 5-20 kPa의 맥동 압력(평균 15.78 ± 4.5 kPa)이 세포 접착, 증식, 세포 사멸, 뼈 광물화, 칼슘 항상성, 이온 채널 조절, ROS 및 염증을 포함한 상당한 세포 반응에서 DEG가 있는 hBMSC에서 골형성을 증가시킨다는 것을 나타내었다. 본 발명은 단기 박동 압력 자극이 자극 후 7일 이내에 골 형성 분화를 유의하게 촉진하여 골 재생 과정, 체외 골 이식편 생성 및 의료 기기 제작에 활용할 수 있음을 확인했다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 부드러운 하이드로겔 매트릭스에서 배양된 인간 중간엽 줄기 세포(hBMSC)의 골 형성에 대한 박동성 압력 자극 효과의 개략도.

도 2는 GelMA 및 CelMA 하이드로겔의 물리화학적 특성을 나타낸 그림으로, (a) 제조된 하이드로겔의 점탄성 거동. (b) 상단 패널은 디지털 라이트 프린팅(DLP) 기술을 사용한 하이드로겔의 3D 프린팅 공정 개략도(왼쪽), 하이드로겔의 CAD(Computer-Aided Design) 모델(10x10 x5mm)(오른쪽), 하단 패널은 GelMA(왼쪽) 및 CelMA 하이드로겔(오른쪽)의 인쇄 과정, 검은색 화살표: 스테이지 이동 방향, 빨간색 리본: GelMA, 검은색 선: 입자 간 상호작용, 녹색 입자: CNC. (c) 지지체의 FE-SEM 이미지 및 C, N, S 및 O에 대한 지지체의 해당 EDX 요소 매핑 (d) 7일 동안 팽창 전후에 제작된 하이드로겔의 압축 강도 (g) 팽창 평형 팽창까지 하이드로겔의 거동. 스케일 바: 1mm.

도 3은 제조된 하이드로겔의 체외 생체 적합성 평가를 나타낸 그림으로, (a) 생물 반응기 설정의 개략도. (b) 압력 압력계를 사용하여 기록된 PPS(박동성 압력 자극) 그래프. (c) 표시된 시간 간격에서 PPS가 있는(w) 및 없는(w/o) hBMSC의 WST-8 분석. (d) ROS 소거 분석; 상응하는 강도 프로파일을 갖는 PPS(5-20 kPa) 후 2시간 배양 후 hBMSC에서 DCF-DA의 녹색 형광 이미지. (e, f) hBMSC w/wo PPS(5-20 kPa)에서 팽실린 발현의 형광(왼쪽 패널) 및 공초점(오른쪽 패널) 현미경 이미지; 액틴(노란색), 팽실린(녹색), DAPI(파란색). (g) 배양 7일 후 ARS(흰색 점선은 하이드로겔 가장자리를 나타내고 흰색 화살표는 광물화 부위를 나타냄) 및 ALP 염색 방법(검정색 화살표 머리는 hBMSC에서 발현된 ALP를 나타냄)을 사용한 hBMSC W/WO PPS의 광물화 분석. (h) 2D 및 3D 배양 조건에서 광물화 분석의 정량적 분석. (i) 골형성 마커 유전자 RUNX2, ALP, Col1, BSP, OPN, OSX, RANKL, NF-κB의 실시간 qPCR 분석. (j) 골형성 마커 단백질(Runx2 및 ALP) 및 신호 전달 경로 단백질(MEK1 및 ERK 1/2)의 단백질 마커 발현의 형광 이미지. (k, l) 대조군 세트에 대한 배양 7일 후 PPS에 대한 hBMSC의 Secretome 분석; (k) 선택된 점의 정규화된 상대 강도, (l) PPS w/w로 배양된 hBMSC의 상청액과 함께 인큐베이

선된 인간 프로테오마 사이토카인 어레이 C5. #1, TIMP1; #2, TIMP2; #3, TGF 베타-1; #4, TGF 베타-2; #5, OPG(TNFRSF11); #6, IGFBP-2; #7, IGFBP-3; #8, IGFBP-4; #9, IP-10(CXCL10); #10, LIF; #11, NT-3; #12, NAP-2; #13, MIP-1 베타(CCL4); #14, IL-6; #15, IL-8; #16, IL-10; #17, 란테스(CCL5); #18, OSM. 데이터는 3회 반복 실험의 평균 $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 에서의 통계적 유의성임. 스케일 바: 10mm, 100 μ m 및 25 μ m.

도 4는 PPS 시 hBMSC의 전사체 변화를 나타낸 그림으로, (a) 골형성 분화에 관한 차등적으로 발현된 유전자(DEG)의 히트맵. 각 열은 샘플을 나타내고 각 행은 유전자를 나타냄. (b) 유전자 발현의 변화에 대한 쌍별 산점도 분석. 그래프의 각 점(파란색, 빨간색, 검은색)은 유전자를 나타냄. 이등분선을 따라 점은 비교된 두 샘플에서 유사하게 표현됨. 이등분선에서 더 멀리 떨어진 점은 더 높은 차등 발현을 나타냄. (c) 표시된 배양 조건에서 발현된 유전자 수의 벤 다이어그램, (d) 조골 세포 분화에 관한 DEG의 정량적 플롯, (e) 높은 수준의 주요 단백질의 단백질 상호 작용 맵 골 형성 분화와 관련된 0.900/1의 가장자리 신뢰도, (f) 뼈 광물화와 관련하여 차등적으로 발현되는 유전자의 히트맵. 각 열은 샘플을 나타내고 각 행은 유전자를 나타냄. (g) 뼈 광물화에 관한 DEG의 정량적 플롯, (h) 칼슘 항상성에 관한 DEG의 정량적 플롯, (i) 세포 신호 경로에서 기계적 자극 및 그 배치에 따른 골형성 분화에 관여하는 DEG.

도 5는 PPS 시 hBMSC의 전사체 변화를 나타낸 그림으로, (a) 이온 채널 발현과 관련된 차등적으로 발현된 유전자(DEG)의 히트맵. 각 열은 샘플을 나타내고 각 행은 유전자를 나타냄. (b) 이온 채널 발현에 관한 DEG의 정량적 플롯, (c) 초점 접착과 관련하여 차등적으로 발현된 유전자의 히트맵. 각 열은 샘플을 나타내고 각 행은 유전자(d) 초점 접착에 관한 DEG의 정량적 플롯, (e) 기계적 자극 및 세포 신호 경로에서 그들의 위치에 대한 세포외 기질(ECM) 및 초점 접착에 관여하는 DEG. OM-골형성 매체; DMEM-세포 배양 배지; C-OM(w/o P) - 압력 자극이 없는 CelMA-골형성 매체, C-OM(w/P) - 압력 자극이 있는 CelMA-골형성 매체.

도 6은 PPS가 있거나 없는 세포 생리학적 행동의 변화에 대한 개략도. RANKL- 핵 인자 카파-B 리간드의 수용체 활성화제; ROS 반응성 산소종, ALP, BSP, OPN, OSX, NF-kB는 골형성 특이적 유전자를 나타냄. BMP, MAPK, Wnt는 기계적 자극에 따라 변경된 세포 내 신호 전달 경로를 나타냄. 파란색 아래쪽 화살표는 대조군 샘플에서 더 낮은 발현을 나타냄. 빨간색 위쪽 화살표는 기계적 자극 시 hBMSC에서 더 높은 발현을 나타냄.

도 7은 (a) 젤라틴 및 (b) GelMA의 ¹H NMR 스펙트럼은 GelMA에서 메타크릴레이트 기의 성공적인 결합을 나타냄 (노란색으로 표시).

도 8은 (a) GelMA, (b) CNC 및 (c) CelMA 하이드로겔의 FTIR 스펙트럼.

도 9은 (a) GelMA 및 (b) CelMA 지지체의 형태 및 원소 조성.

도 10은 박동 압력 생물 반응기 설정. (a) 폐쇄형, (b) 개방형 형태의 맞춤형 박동 압력 챔버. (c) 0kPa 압력에서 생물 반응기 작동 (d) 10kPa 압력에서 생물 반응기 작동. 공기압은 외부 펌프를 사용하여 제어되었습니다. (e, f) 조립된 카트리지 반응기 (e) 평면도, (f) 측면도. (g) 조립되지 않은 카트리지 반응기(평면도). (h) (i) 이식된 3D 인쇄 스캐폴드와 함께 카트리지 반응기에 삽입된 6웰 플레이트.

도 11은 3일 배양 후 GelMA 및 CelMA 하이드로겔 w/wo PPS에서 배양된 hBMSC의 라이브/데드 분석.

도 12는 hBMSCs w/wo PPS에서 분비되는 ALP의 정량적 분석.

도 13은 칼슘 항상성에 관련된 0.900/1의 높은 가장자리 신뢰도를 갖는 주요 단백질의 단백질 상호 작용 맵

도 14는 (a) ROS 대사 과정, (b) ER-스트레스 반응, (c) PPS 시 미토콘드리아 대사 과정에 관여하는 DEG.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0082] 본 발명에서 먼 펄프(10- 20 nm 너비, 50-400 nm 길이, 12% 고형분, 결정성 지수: >70%)에서 추출한 셀룰로오스 나노결정(CNC), 돼지 피부에서 추출한 젤라틴 A형 분말(순도: $\geq 98\%$, 젤 강도 약 300g 블룸), 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(LAP) 및 메타크릴산 무수물은 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA에서 구입했다.

[0083] Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 및 항생제는 대한민국 Welgene Inc.에서 구입했다. 트립신-에틸렌 디아민 테트라 아세트산

(Trypsin-EDTA)은 미국 Gibco에서 제공했다. 골유도 배지, 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI) 및 alizarin red(ARS) 염색 키트는 미국 Sigma-Aldrich에서 구입했다. WST-8 염료(EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit®) 및 Alexa Fluor 접합 모노클로날 항체는 대한민국 DoGenBio Co., Ltd. 및 미국 Santa Cruz Biotechnology에서 각각 구입했다. TRIzol® 시약, Acridine 오렌지 및 Ethidium bromide 염료는 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA에서 구입했다. cDNA 합성 키트는 Invitrogen, Gaithersburg에서 구입했다. SYBR Green Master mix는 미국 Bio-Rad Laboratories에서 공급했다. 유전자 프라이머는 대한민국 대전에 소재한 BIONEER® Inc.에서 공급되었다.

[0084] 실시예 1: 생물반응기 설계

[0085] 맞춤형 설계된 생물반응기 시스템은 압력 제어 장치(낮음, 0-100Pa 및 높음, 0-100kPa), 진공 펌프 이중 실린더 (35-40L/min 유량, 진공도 650mmHg) 및 직사각형 금속 카트리지 챔버(160 x 120 x 55 cm)는 배양된 세포에 대한 압력 자극을 위한 웰 플레이트를 고정한다. 공기 압력은 외부 펌프와 2000mL 용량의 설치된 공기 탱크를 사용하여 제어된다. 실시간 압력 자극은 BENETECH 압력 압력계를 사용하여 기록되었다.

[0086] 실시예 2: 바이오 잉크 제형

[0087] 메타크릴레이트 젤라틴(GelMA)의 합성

[0088] GelMA 폼은 이전 보고서에 따라 합성되었다. 요약하면, 유형 A 젤라틴 10g을 100mL 멸균 PBS(pH 7.4)에 용해시킨 다음, 40-45° C에서 2시간 동안 계속 교반하면서 1.6mL의 메타크릴산 무수물을 첨가했다. 2시간 후, 2배 따뜻한 PBS를 첨가하고 10분 동안 교반하여 반응을 중단시켰다. 생성된 용액을 투석관(12-14 kDa 컷오프 분자량)을 사용하여 멸균 증류수에 대해 5-7일 동안 투석하여 메타크릴산을 제거하였다. 다음으로, GelMA 용액을 농축하고 7일 동안 동결건조하여 백색 거품을 수득하고 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다. GelMA-CNC 잉크는 다음과 같이 제조되었다. 요약하면, 12%(부피 퍼센트) GelMA를 40° C에서 DW에 용해시킨 다음 균질한 용액이 얻어질 때까지 2% CNC(wrt. GelMA)를 첨가했다. 다음으로, 상기 GelMA-CNC 하이드로겔 용액에 0.25% 광개시제(LAP)를 첨가하였다. 3D 프린팅에 하이드로겔을 조심스럽게(기포를 형성하지 않고) 사용했다.

[0089] 3D 프린팅

[0090] 10x10x5 구조는 Solid Works 소프트웨어(www.solidworks.com, Dassault Biosystems, France)로 설계되었으며 StereoLithography(STL) 파일로 내보냈다. 새로 인쇄하기 전에 모든 STL 파일은 맞춤형으로 설계된 슬라이서 소프트웨어(Carima Slicer, v2.0.3, 대한민국)를 사용하여 슬라이싱되었다. DLP 프린팅을 위한 Vat으로 프린팅 가능한 레진을 직접 사용하였다. DLP 프린터에는 평균 강도가 400루멘인 405nm UV-LED의 UV 디지털 미러 장치(DMD)가 장착되었으며, 빌드 해상도(xy)는 1920 × 1080mm(엔진 해상도), 빌드 크기(xyz)는 각각 96 × 54 × 150mm이었다. z축 두께 및 픽셀 크기는 0.1mm/층 및 50 μm로 설정되었다. 프린터의 전체 치수는 각각 300 × 320 × 650mm이었다. DLP 프린터에는 1800W의 405nm UV 광원과 공기 냉각 시스템을 갖춘 초고속 경화 모듈(CL1800, Carima, Korea)도 장착되었다. 인쇄 후, 스케폴드는 1-2분 동안 365 nm UV 조사를 사용하여 광가교되었다. 인쇄된 스케폴드는 시험관 내 세포 배양을 위한 pH 조정을 위해 DMED에 보관되었다.

[0091] 실시예 3: 화학적 특성화

[0092] 유연학적 분석

[0093] 레올로지 분석은 실온에서 6mm 평형 플레이트가 있는 ARES-G2 레오미터(TA Instruments, New Castle, Delaware, USA)를 사용하여 수행되었다. 하이드로겔은 흐름 스윙을 특징으로 한다. CNC가 없는 GelMA 하이드로겔을 대조군으로 간주했다.

[0094] 팽윤 테스트

[0095] 팽윤율을 측정하기 위해 3D 프린팅된 샘플(10 x 10 x 5 mm)을 동결 건조하고 샘플의 건조 중량을 기록했다(Wdry). 다음으로, 샘플을 37° C에서 1mL 1x PBS에 침지하여 평형 팽창에 도달했다. 마지막으로, 스케폴드를 얼룩지게 하고 각 샘플의 팽윤된 중량을 다른 시간 간격(0, 2, 8, 10 및 12시간)에서 기록(Wwet)했다.

[0096] 팽윤율은 식에 따라 계산하였다.

[0097]
$$\text{팽윤율}(\%) = (W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}) / W_{\text{dry}} \times 100$$

- [0099] 형태학적 분석
- [0100] 인쇄된 지지체의 형태는 15.0 kV/cm의 가속전압으로 주사전자현미경(UR-SEM, Hitachi-S4800, California, US A)으로 분석하였다. 모든 이미지는 500 nm, 5 μ m 및 200 μ m 해상도에서 촬영되었으며 대조군과 비교되었다.
- [0102] 실시예 4: 시험관 내 연구
- [0103] 세포 배양
- [0104] hBMSCs는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Republic of Korea)으로부터 받았고, 페니실린(10,000 units/mL), 스트렙토마이신(10,000 μ g/mL), 및 암포테리신 B(25 μ g/mL)(Steri-Cycle 370 Incubator, Thermo Fisher Scientific, USA)이 보충된 DMEM을 사용하여 5% CO₂의 가습 분위기에서 37° C에서 배양하였다. hBMSC를 인쇄된 GelMA 및 GelMA-CNC 스캐폴드에 시드하고 24시간 동안 정적 조건에서 배양했다. 세포 부착 후, 10.37 $\pm$ 2.94kPa의 평균 압력 자극 하에서 10분 동안 박동성 압력 자극을 위해 hBMSC가 실린 GelMA 및 GelMA-CNC 스캐폴드 한 세트를 사용했다. 압력 자극이 없는 세포를 대조군으로 하였다. 본 발명에서는 5번 계대 세포를 사용했다. 골형성 유도를 위해, 50 μ g/mL L-아스코르브산, 10mM β -글리세로포스페이트 및 100nM 텍사메타손이 보충된 DMEM을 함유하는 골형성 유도 배지에서 세포를 배양하였다.
- [0105] 세포 생존력 분석
- [0106] hBMSC(1×10^4 세포/100 μ L 배지)를 96웰 플레이트에 접종하고 선택한 기간(1, 3 및 5 일) 동안 37° C에서 2% CNC를 포함하는 GelMA-CNC 스캐폴드와 함께 인큐베이션했다. GelMA 스캐폴드로 배양된 hBMSC를 대조군으로 간주했다. 세포 생존력은 WST-8 분석을 사용하여 분석되었다. 원하는 배양 기간 후, 10 μ L의 WST-8 염료를 첨가하고 2시간 동안 인큐베이션하였다. 생성된 포르마잔을 450 nm(625 nm를 기준값)에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 모든 실험은 세 번 수행되었으며 데이터는 평균 OD $\pm$ 표준 편차로 표시된다. 통계적 유의성은 $p^* < 0.05$ 에서 고려되었다.
- [0107] 생사 분석
- [0108] hBMSC(4×10^4 세포/100 μ L 배지)는 정적 및 압력 자극 모두에서 5% CO₂와 함께 37° C에서 6웰 플레이트의 GelMA 및 GelMA-CNC 스캐폴드에 시딩되었다. 정적 배양 하에 성장한 세포를 대조군으로 취하였다. live-dead assay를 위해 세포를 1x PBS로 세척한 후 1 μ L의 acridine orange와 ethidium bromide 염료 용액을 1:1 비율로 처리하였다. 이미지는 도립 형광 현미경(DMi8 시리즈, Leica Microsystems, Germany)의 Leica Microsystems Suite X 소프트웨어(Leica Microsystems, Germany)를 사용하여 적절한 필터 채널에서 즉시 캡처되었다. FSS 처리된 세포의 생존 가능성은 인큐베이션 3일 후 살아있는 죽은 형광 이미지를 사용하여 분석되었다.
- [0109] PPS의 활성산소종(ROS) 평가
- [0110] hBMSCs에서 H₂O₂로 유도된 산화 스트레스는 PPS가 있는 상태에서 이전에 보고된 DCF-DA를 사용하여 자유 라디칼 종의 형성을 관찰하고 약간 수정하여 평가했다. 요약하면, 세포는 2×10^4 의 밀도로 배양되었다. 다음으로, 세포와 양성 대조군은 CO₂ 인큐베이터에서 37° C에서 200- μ M H₂O₂와 함께 인큐베이션되었다. H₂O₂ 처리하지 않은 세포를 음성 대조군으로 하였다. PPS 후, 세포를 20 μ M DCF-DA와 함께 30분 동안 인큐베이션했다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, 핵을 DAPI로 30초 동안 대조염색하였다. DCF-DA 형광 강도는 형광 현미경을 사용하여 확인했다(ex/em = 485/538). DCF-DA의 각 강도는 세포 내 ROS 형성의 정량 분석을 위해 ImageJ 소프트웨어(ImageJ v1.8, NIH Lab., Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/>)를 사용하여 측정되었다.
- [0111] 액틴 형태
- [0112] 10.37 $\pm$ 2.94 kPa가 세포 골격에 미치는 영향을 가시화하기 위해 형광 이미지를 통해 F-액틴의 배열을 연구했다. hBMSC(2×10^4 세포/100 μ L 배지)는 배양 3일 후 정적 및 박동 압력 자극 하에 GelMA 및 GelMA-CNC 스캐폴드에서 배양되었다. 세포의 염색은 일부 수정으로 앞서 설명한 대로 수행되었다. 요약하면, 세포를 PBS로 세척하고 실온에서 15분 동안 3.7% 파라포름알데히드(PFA)로 고정한 다음 실온에서 10분 동안 세포를 투과화하기 위해 0.1% Triton X-100을 첨가했다. 세포를 PBS 완충액으로 2회 행구고 1% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 투과된 세포를 PBS로 행군 다음 200 μ L Alexa Fluor(AF) 488 F-액틴 프로브(ex/em = 488/518)와 함께 30분 동안 배양

하여 F-액틴을 시각화했다. 핵 염색은 암실에서 2분 동안 1 mg/mL DAPI 용액 20 μ L을 첨가하여 수행했다. 염색된 세포를 행구고 장착 배치와 유리 커버슬립으로 덮었다. 형광 이미지는 40X 배율에서 형광 현미경으로 촬영되었다. ImageJ 소프트웨어(ImageJ v1.8, NIH Lab., USA, www.imagej.nih.gov)를 사용하여 이미지의 ROI 강도를 정량화했다.

[0113] 광물화 연구

[0114] hBMSC의 광물화에 대한 10.37 ± 2.94 kPa의 효과는 자극 7일 후 ARS 절차에 의해 평가되었다. 스캐폴드에서 배양된 세포를 PBS로 행구었다. 세포를 고정하고 실온에서 15분 동안 70% 절대 알코올로 차가운 에탄올 1mL로 투과화했다. 투과된 세포를 500 μ L의 40 mM ARS(pH 4.2) 염색으로 10분 동안 염색한 후 탈이온수로 세척하여 과잉 염색을 제거하였다. 광물화는 광학 현미경을 사용하여 기록되었다.

[0115] RNA 분리, 실시간 PCR(qRT-PCR) 분석 및 전사체 분석

[0116] 압력 처리 및 대조군 세포에서 골형성 마커 유전자의 발현은 qRT-PCR 기술에 의해 평가되었다. 요약하면, 세포 (4×10^4 cells/100 μ L media)는 7일과 14일 동안 골형성 유도 배지에서 실험 조건 하에서 배양된 후, TRIzol® 시약(Thermo Fisher Scientific, USA)에 의해 제조업체의 지침에 따라 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 순도와 농도는 분광광도계로 평가하였다. cDNA는 역전사효소와 SYBR Green Master mix를 사용하여 2 μ g의 RNA에서 합성되었다. mRNA 발현은 Bio-Rad Real-Time PCR(CFX96TM Maestro Real-Time System, Bio-Rad, USA)로 정량화되었다. 반응 조건은 95° C에서 15초 동안 43회 변성 및 60° C에서 1분 증폭을 포함했다. 모든 실험은 3중으로 수행되었고 하우스키핑 유전자 GAPDH에 대해 정규화되었다. CPI 및 대조군의 존재 하에 hBMSC로부터의 상대적 mRNA 발현을 히스토그램에서 비교하였다. 모든 샘플은 실험 동안 3중으로 준비되었다. qRT-PCR 분석에 사용되는 특정 유전자 프라이머는 이전에 보고되었다[Jansen LE, Kim H, Hall CL, McCarthy TP, Lee MJ, Peyton SR. A poly (ethylene glycol) three-dimensional bone marrow hydrogel. Biomaterials. 2022;280:121270;Li J, Wang W, Li M, Song P, Lei H, Gui X, et al. Biomimetic methacrylated gelatin hydrogel loaded with bone marrow mesenchymal stem cells for bone tissue regeneration. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2021;9].

[0117] 다양한 실험군에서 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 평가하기 위해 전사체 분석을 수행하였다. 이를 위해 RNazol(Sigma-Aldrich, USA) 시약으로 골 분화 7일 후 총 RNA를 채취하여 표준 RNA 라이브러리를 제작하였다. Quantiseq 3' mRNA-Seq는 reference genome hg19와 human용 genome database UCSC를 이용하여 차세대 RNA sequencer(Nova-Seq 6000, PE100 bp, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 원시 데이터는 ExDEGA 그래픽 소프트웨어(ebiogen, 대한민국)를 사용하여 처리하고 log2(각 그룹의 정규화된 데이터의 평균)로 정규화하고 Student's t-test를 사용하여 통계 분석을 수행했다. 또한, 다양한 생물학적 경로에서 PPI 농축을 평가하기 위해 웹 기반 생물정보학 도구(DAVID 및 GSEA)를 사용하여 유전자 세트 농축 분석(GSEA) 및 유전자 온톨로지(GO) 분석을 수행했다. 배수 변화가 2.0 이상이고 P 값이 0.05 미만인 유전자(위/아래로 조절됨)는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 마지막으로 STRING 소프트웨어(<https://string-db.org/>)를 사용하여 가능한 상호작용과 공동 발현된 유전자 및/또는 단백질 네트워크를 평가했다.

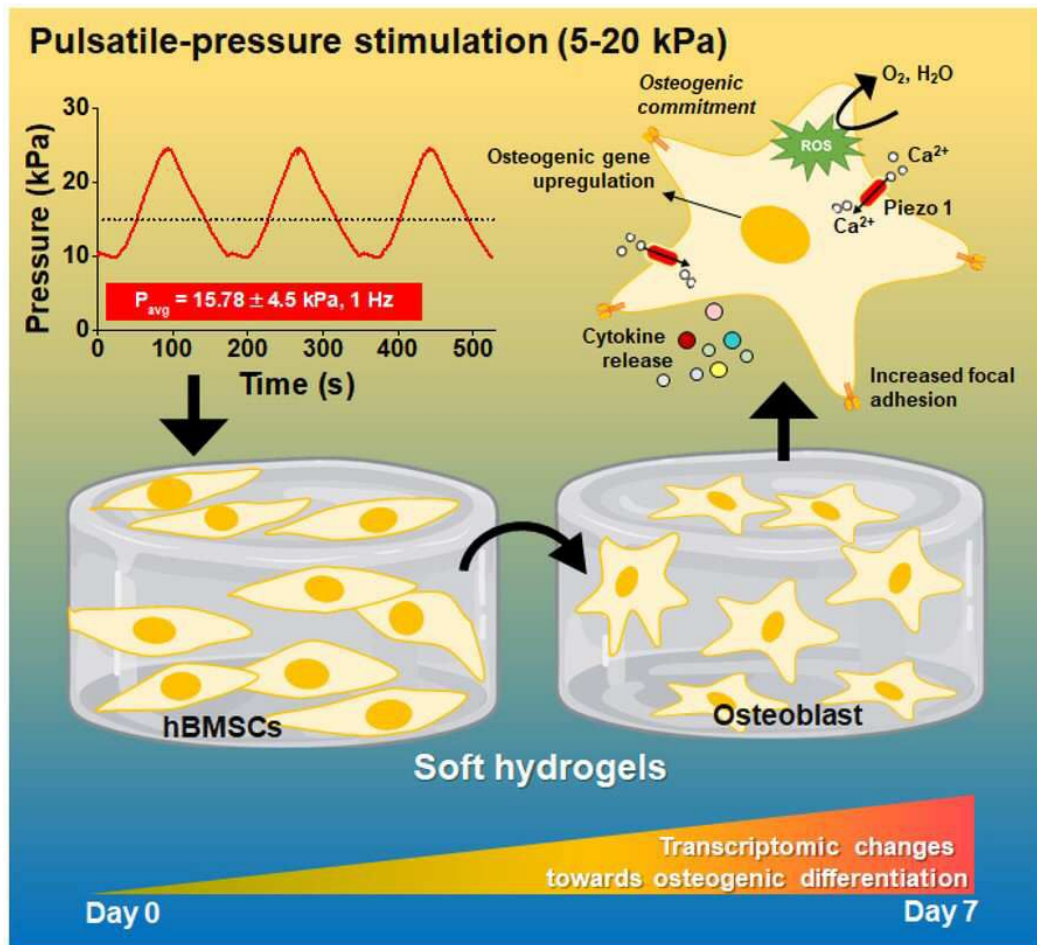
[0118] 면역세포화학 염색

[0119] 골형성 마커 단백질의 발현은 면역세포화학적 염색 과정을 통해 연구되었다. hBMSC(4×10^4 세포/100 μ L 배지)를 정적 및 박동 압력 배양 조건에서 7일 동안 배양했다. 세포 염색은 PBS로 세척한 후 실온에서 15분간 3.7% PFA로 고정하여 수행하였다. 다음으로, 0.1% Triton X-100을 실온에서 10분 동안 첨가하여 세포를 투과화시켰다. 그 후, 세포를 PBS로 2회 행구고, 1% BSA로 차단하고, Runx2 및 ALP에 대한 250 μ L의 마우스 모노클로날 항체와 함께 인큐베이션하였다. 핵은 암실에서 2분 동안 1 mg/mL DAPI 용액 20 μ L로 대조염색되었다. 형광 이미지는 40X 배율에서 형광 현미경으로 촬영되었다.

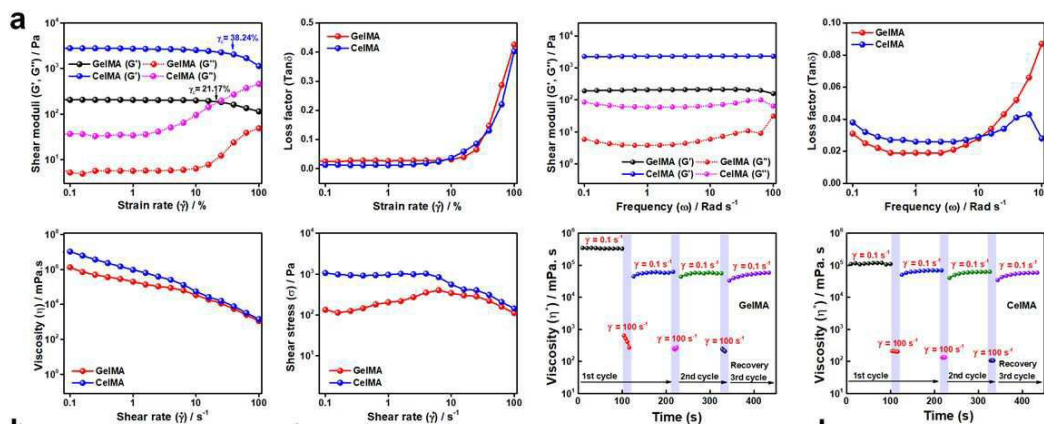
[0120] 본 발명의 모든 체외 데이터 분석에 대한 통계 분석은 OriginPro 9.0 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 대조군과 치료군 사이의 통계적 유의성은 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 차이는 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 에서 유의한 것으로 간주되었다. RNA 시퀀싱 데이터는 edgeR 패키지를 사용하여 TMM 및 CPM 방법을 통해 정규화되었다. 얻은 p-값은 Benjamin을 사용한 다중 비교와 DAVID 소프트웨어 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)를 사용한 FDR(잘못 발견 비율)을 위해 수정되었다.

도면

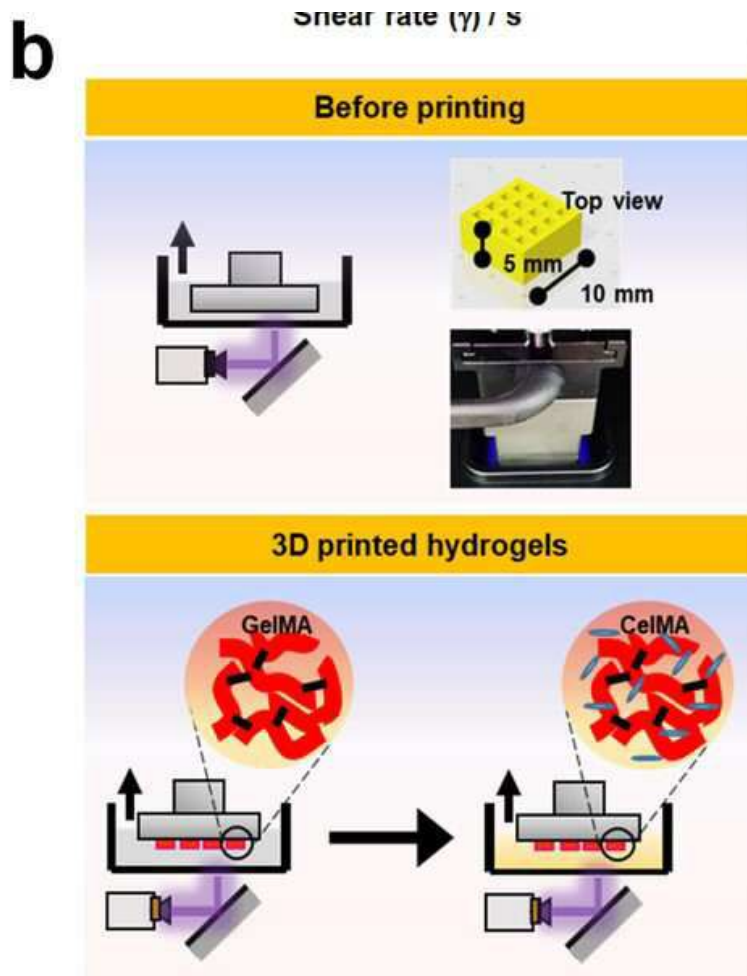
도면1



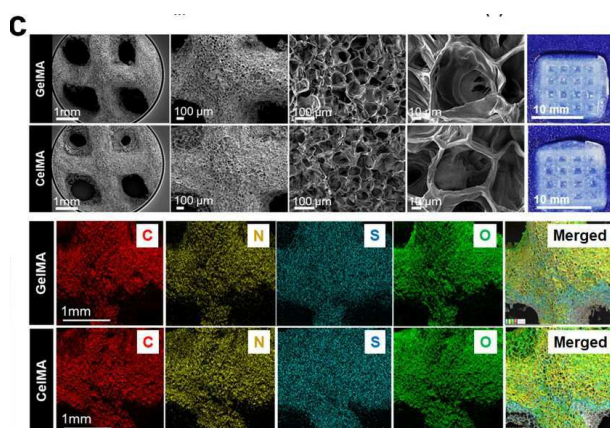
도면2a



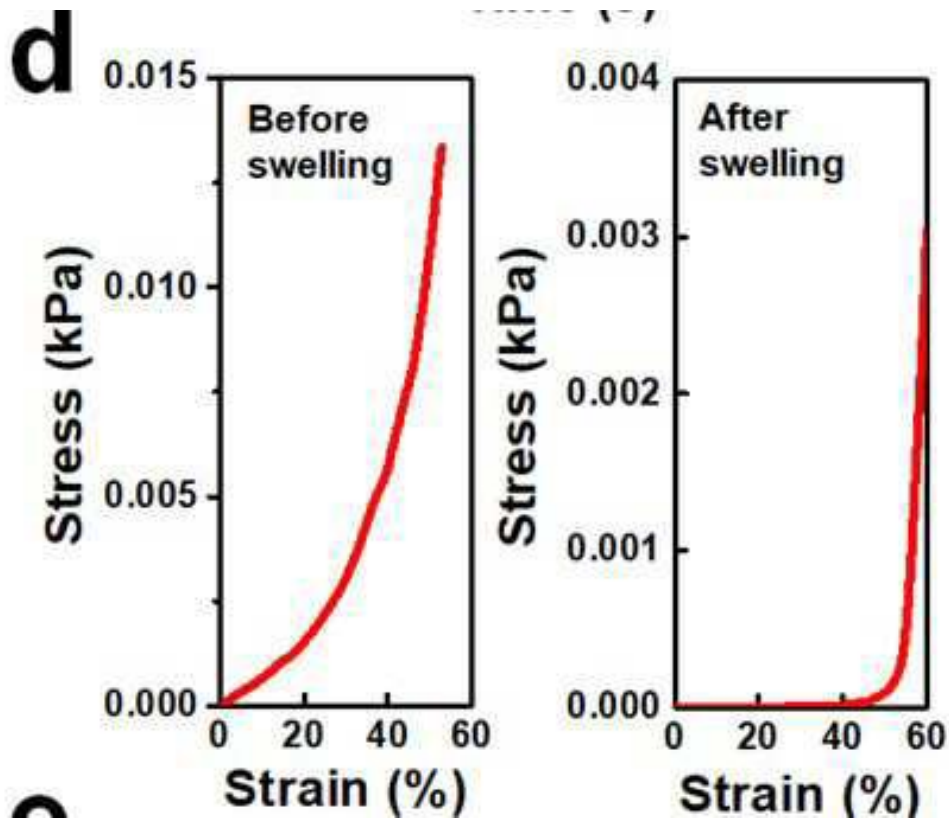
도면2b



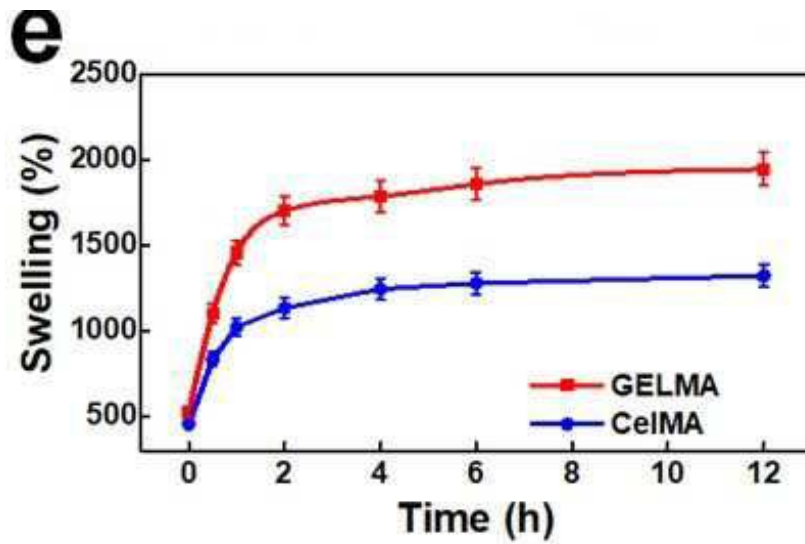
도면2c



도면2d

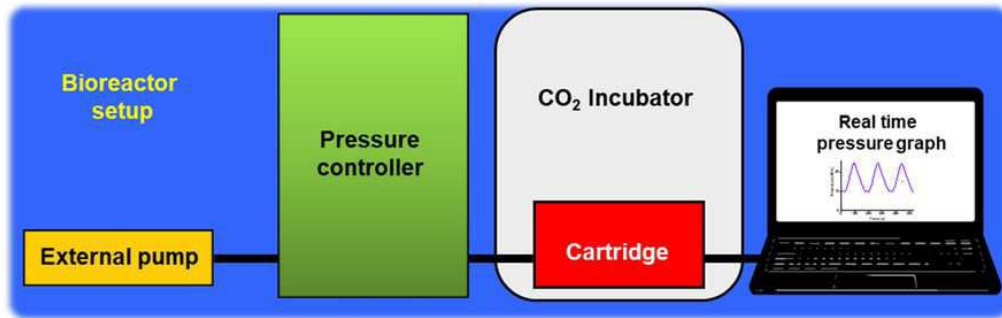


도면2e



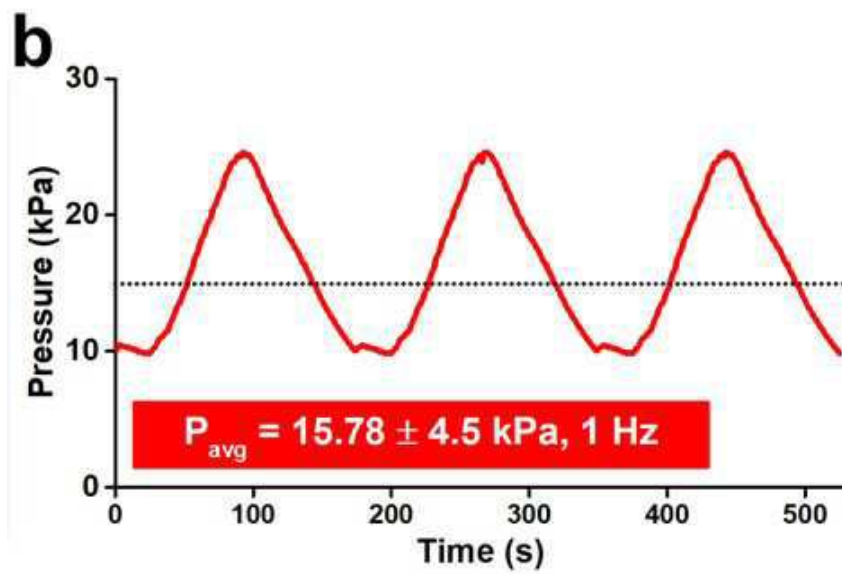
도면3a

a

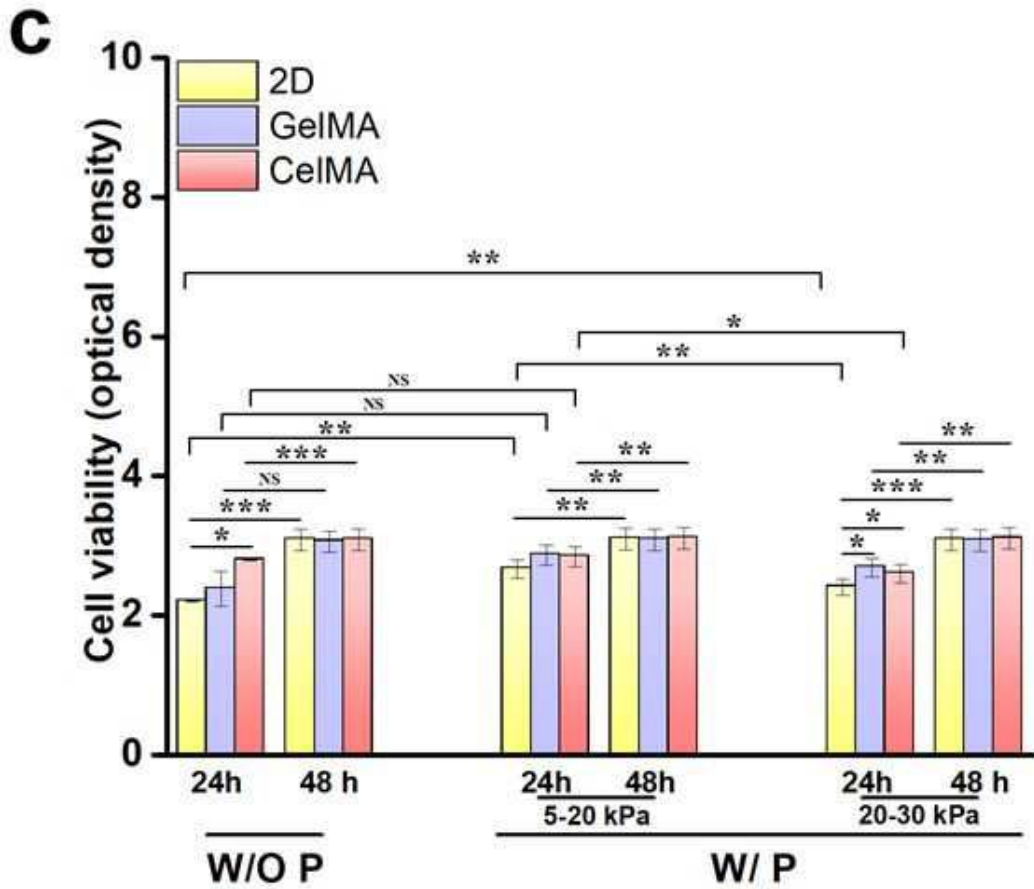


도면3b

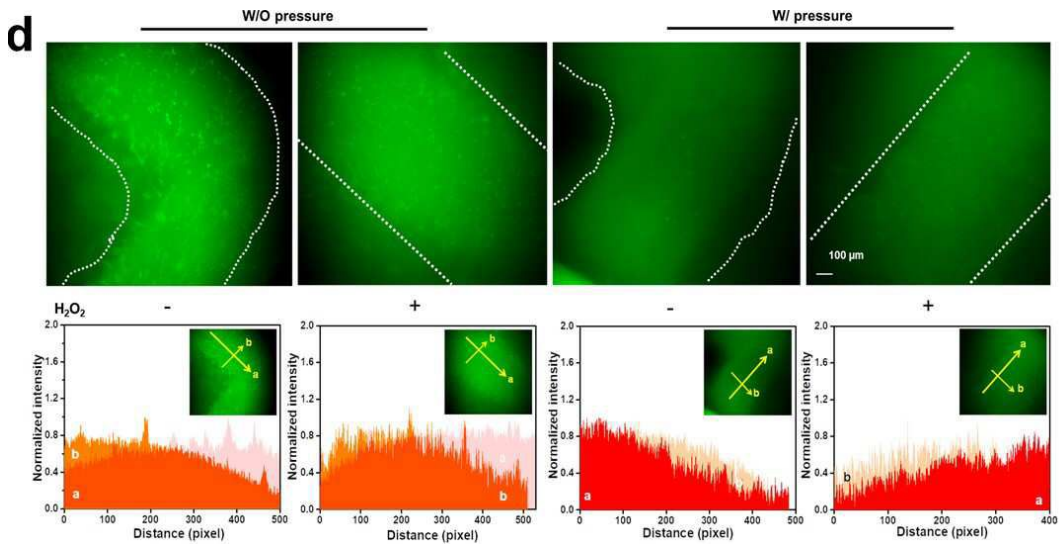
b



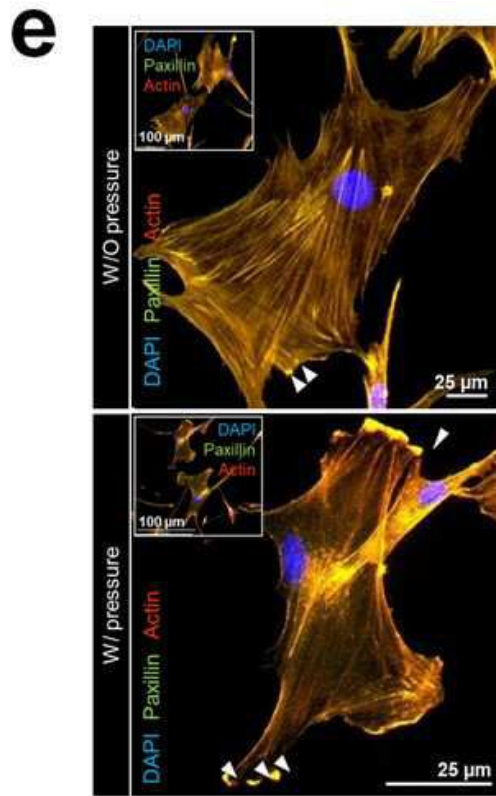
도면3c



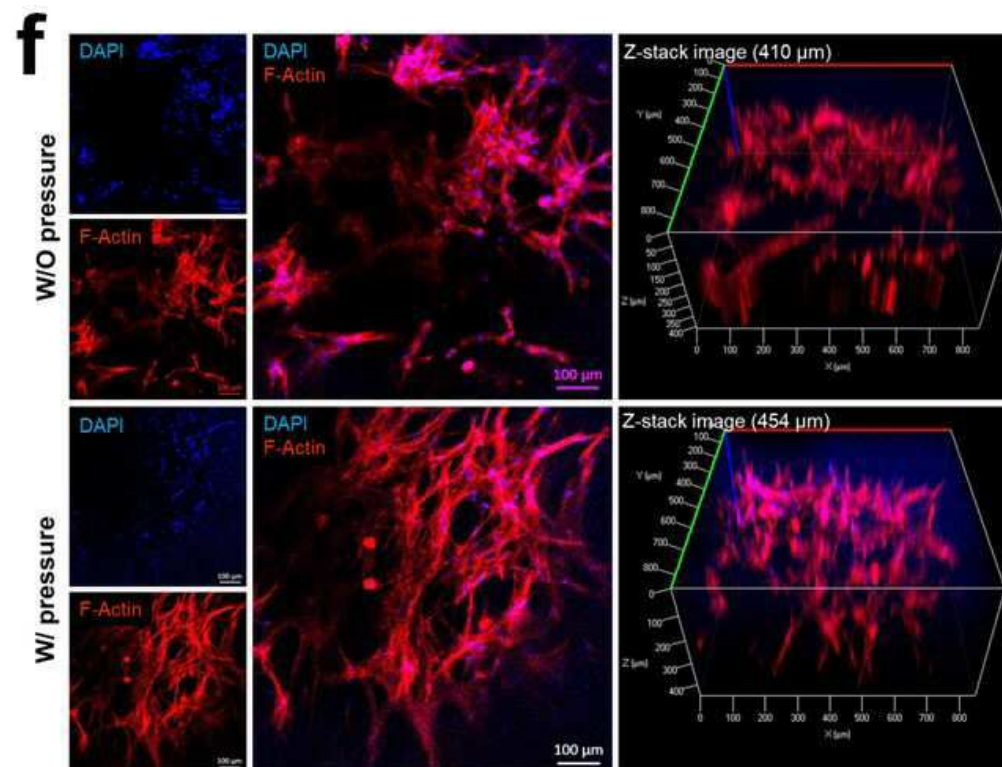
도면3d



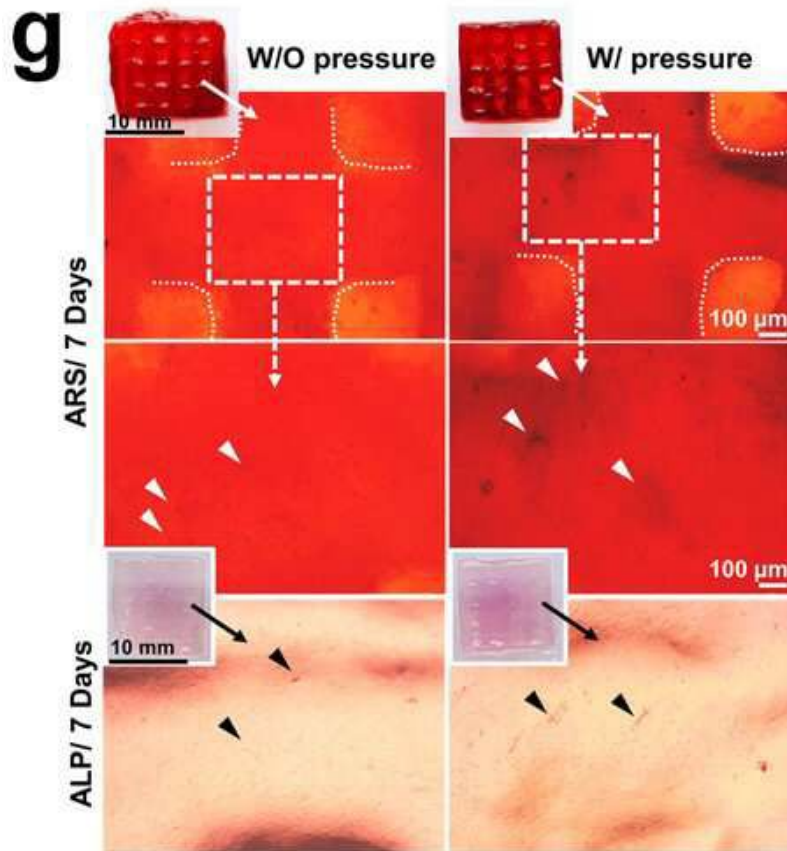
도면3e



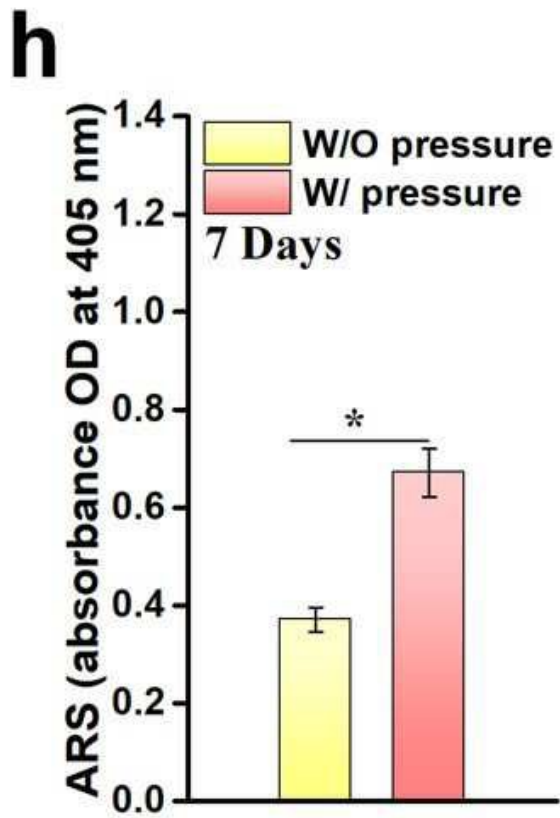
도면3f



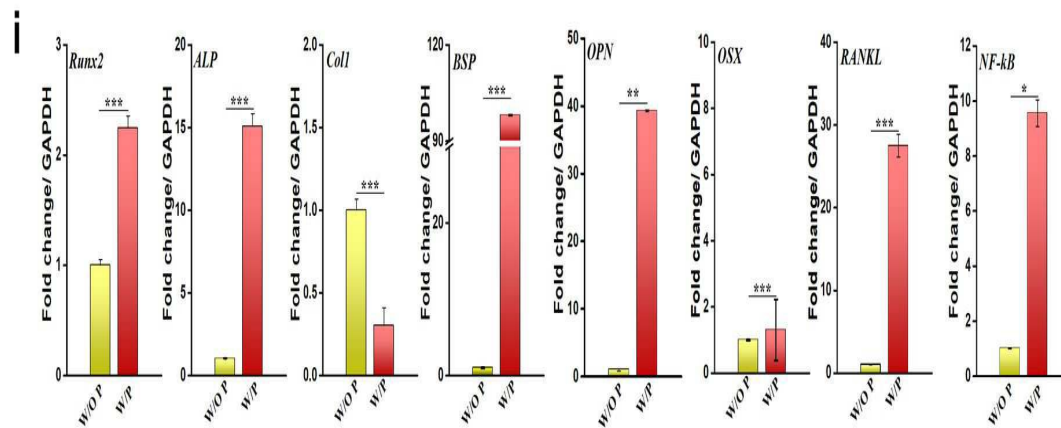
도면3g



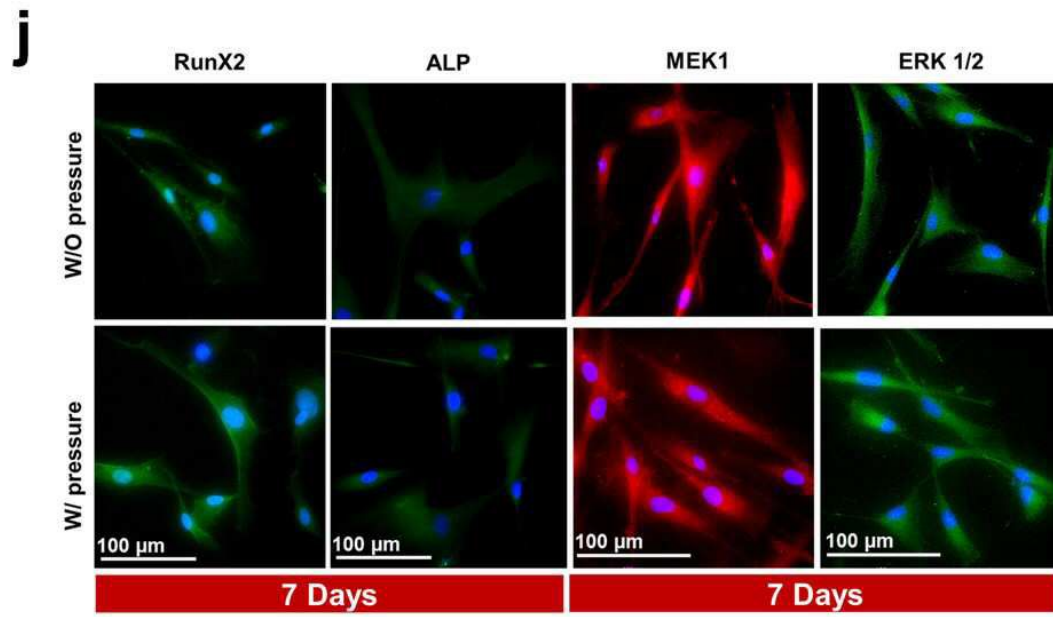
도면3h



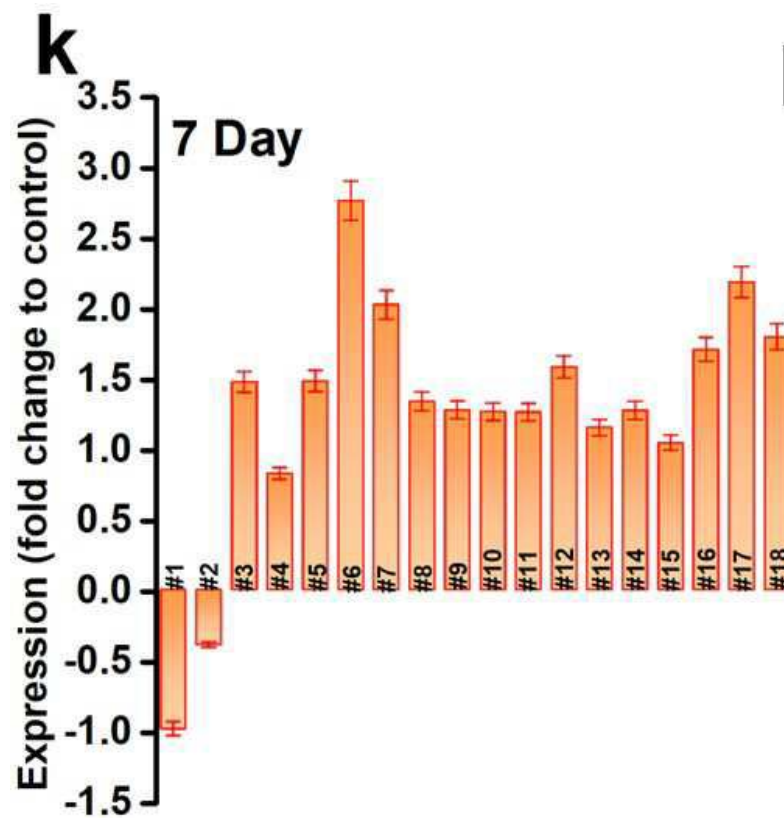
도면3i



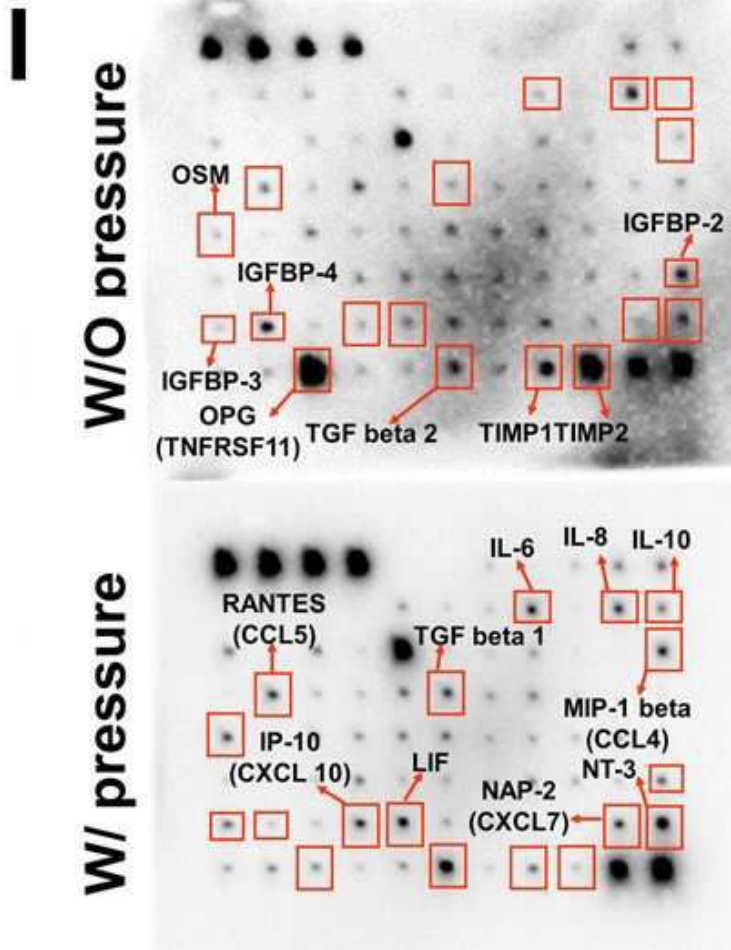
도면3j



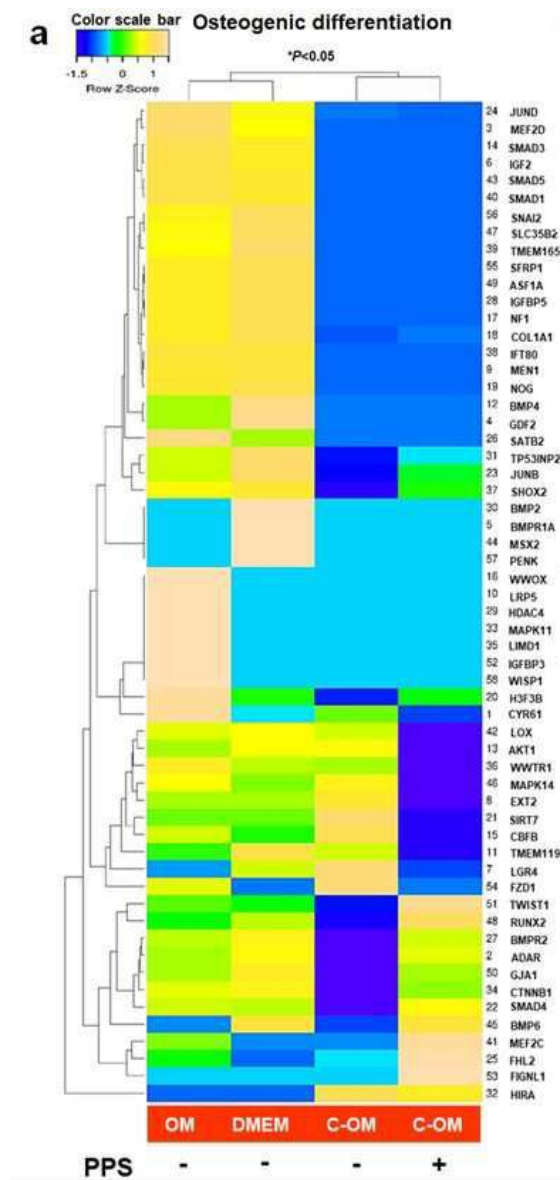
도면3k



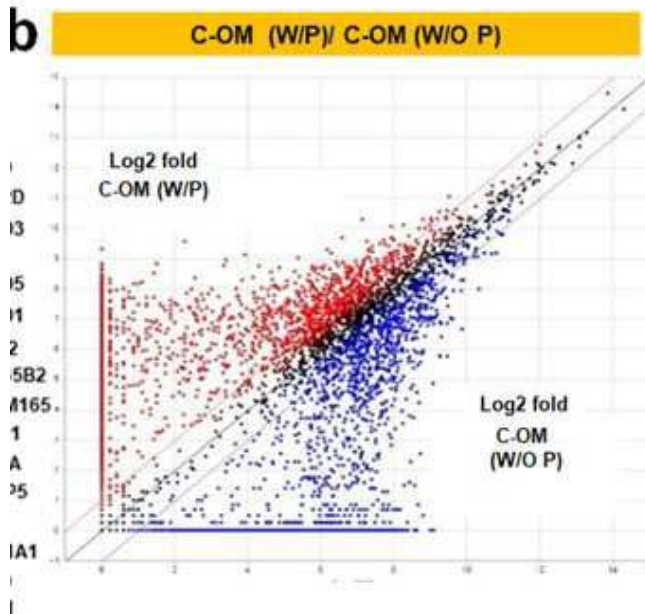
도면31



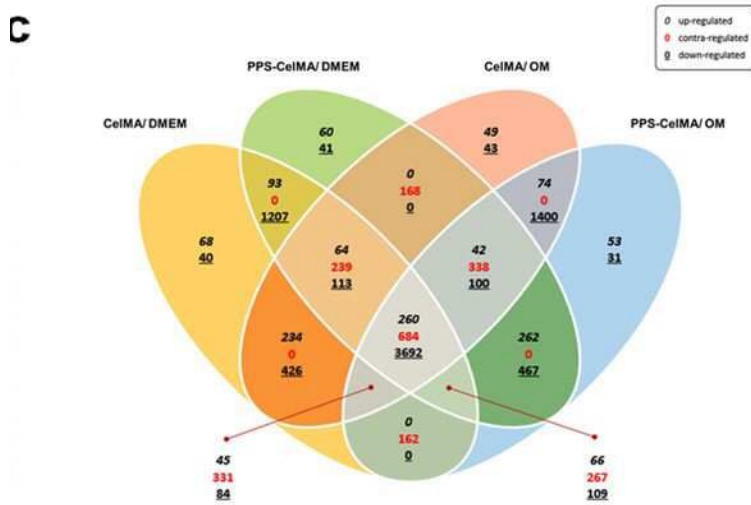
도면4a



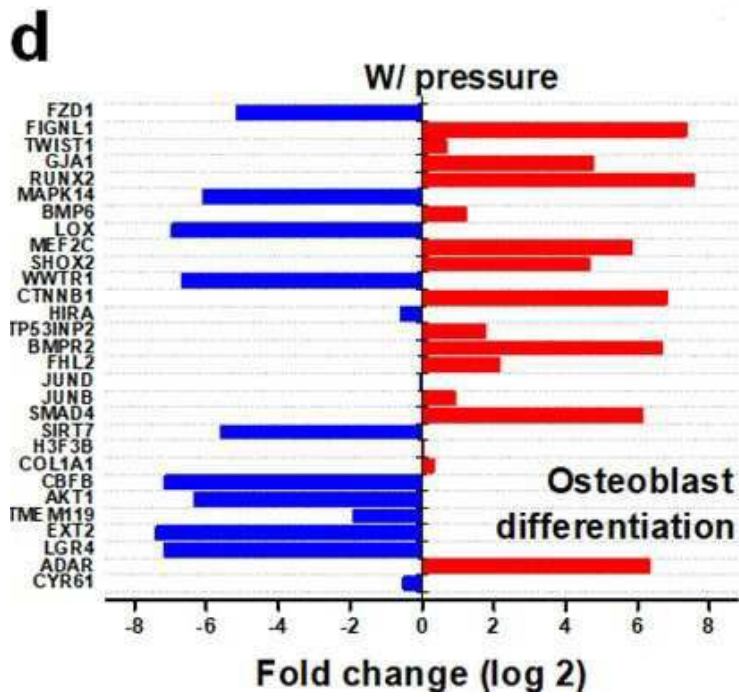
도면4b



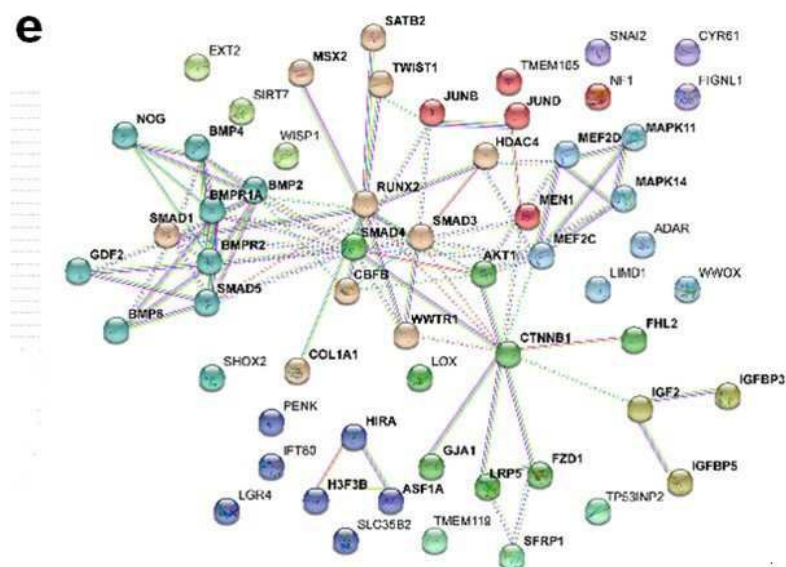
도면4c



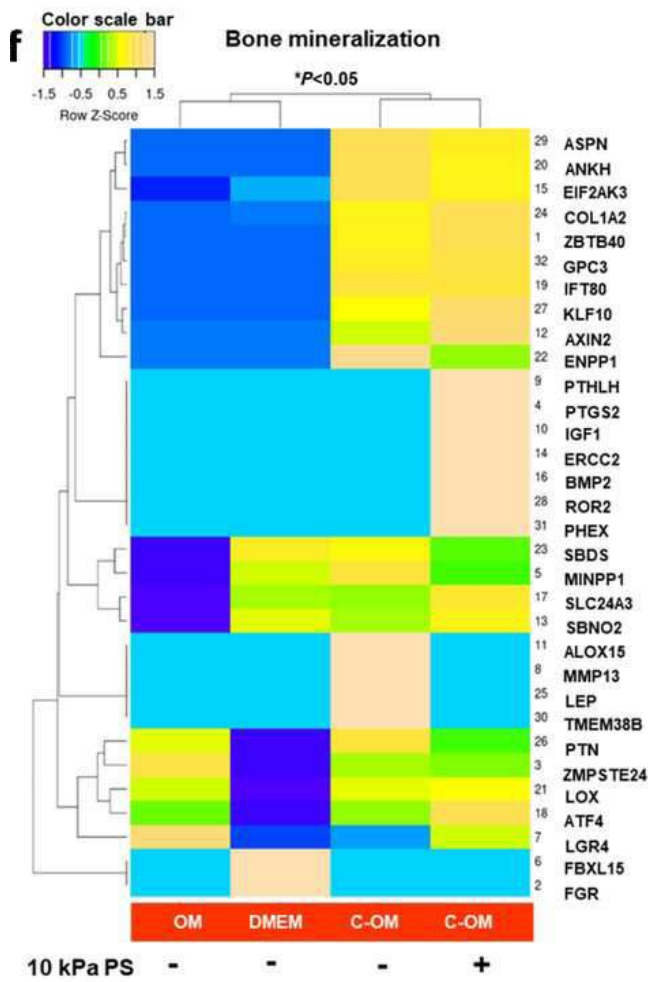
도면4d



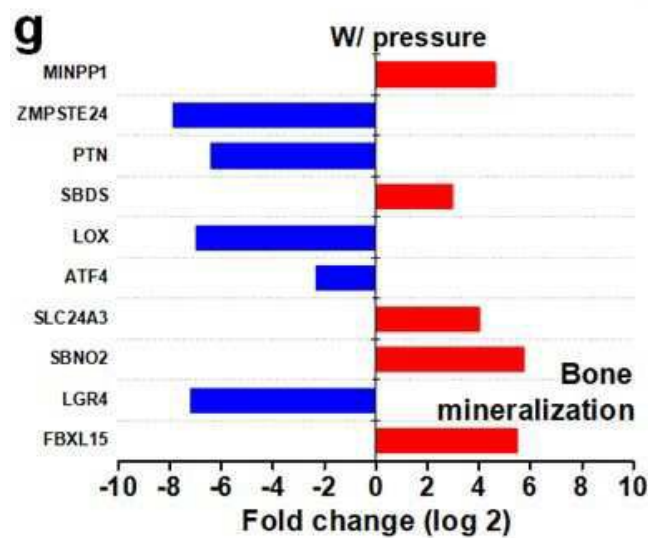
도면4e



도면4f

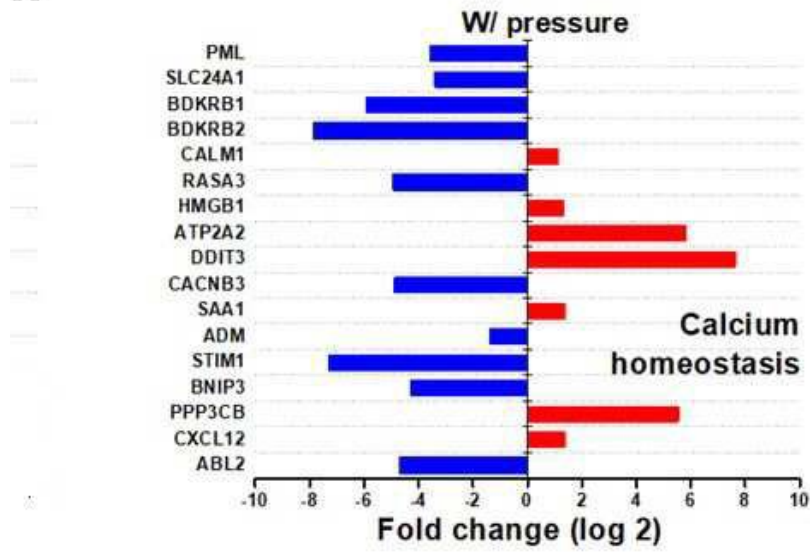


도면4g



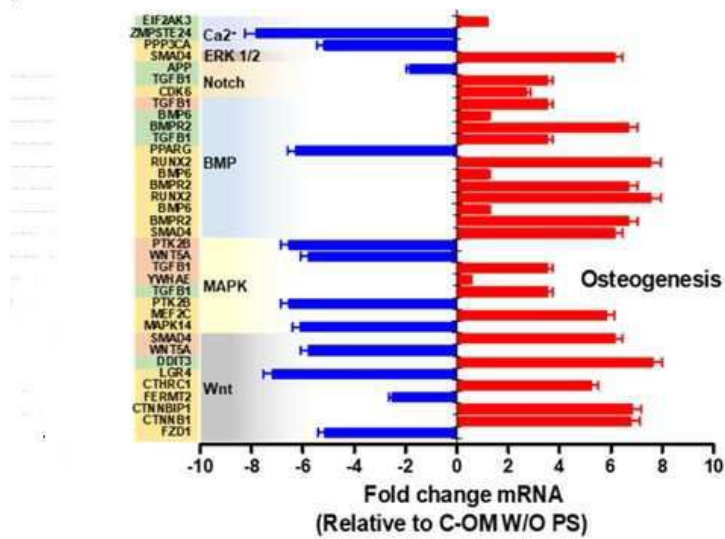
도면4h

h

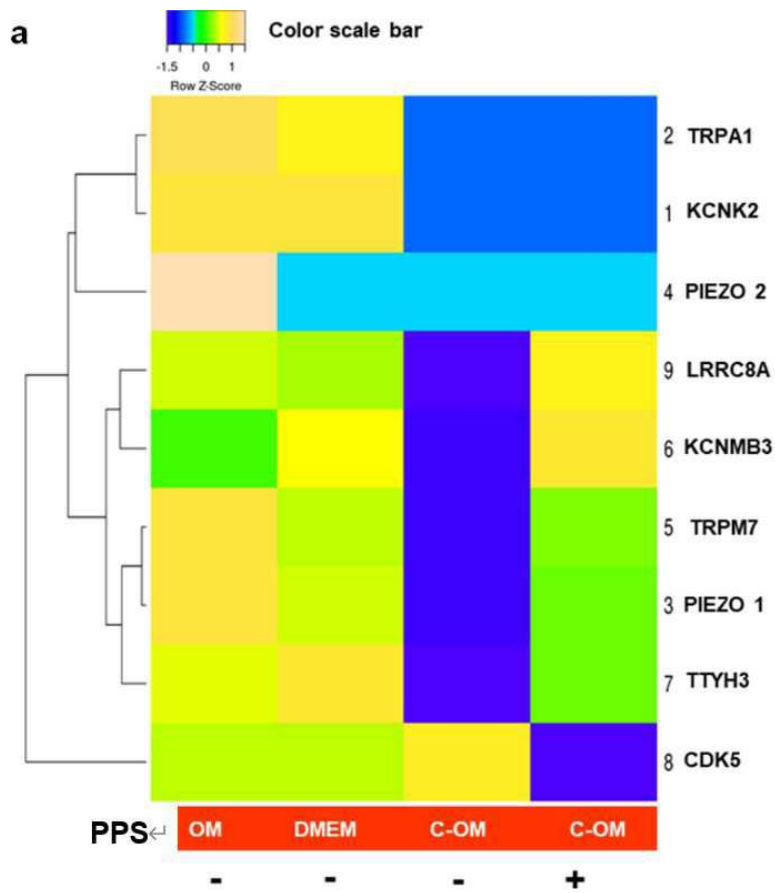


도면4i

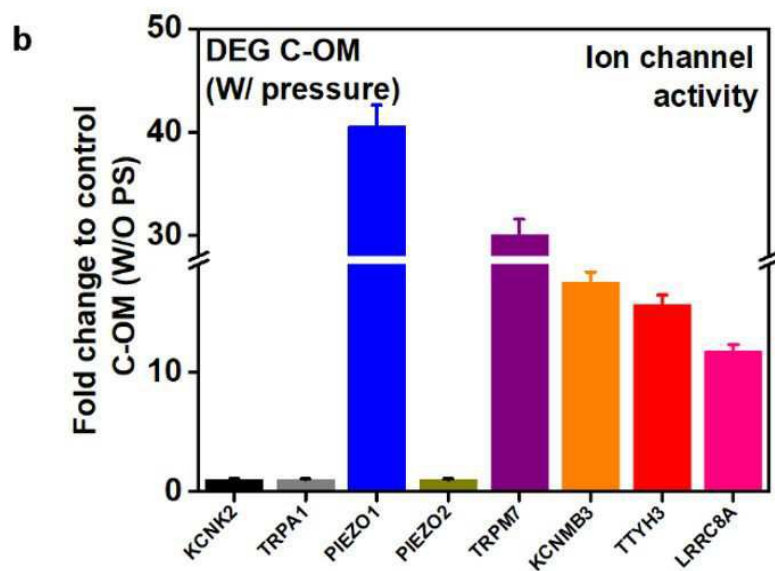
i



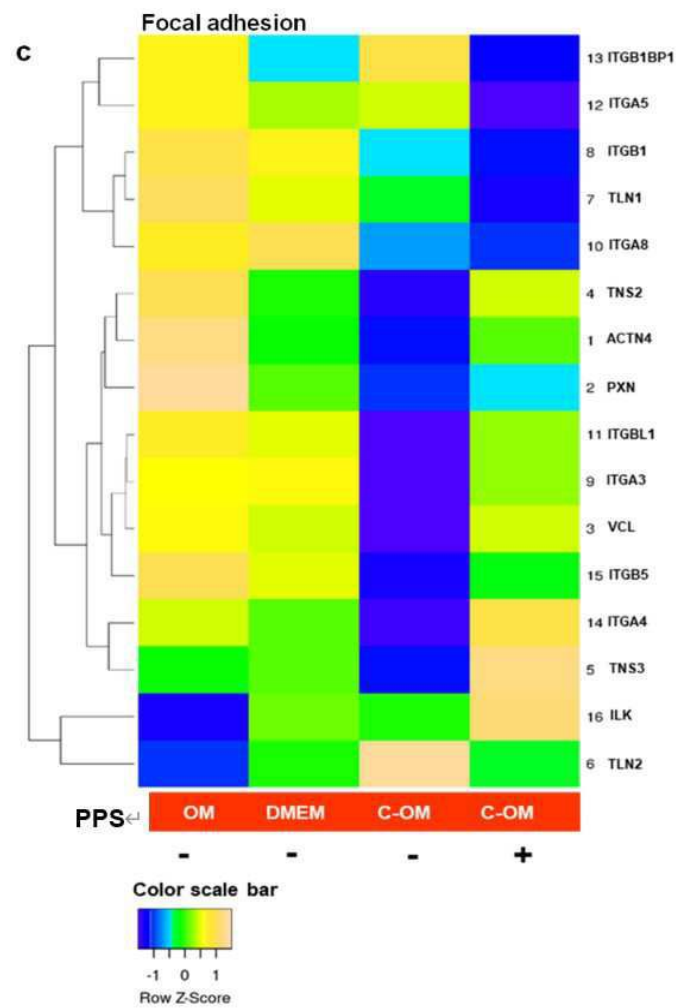
도면5a



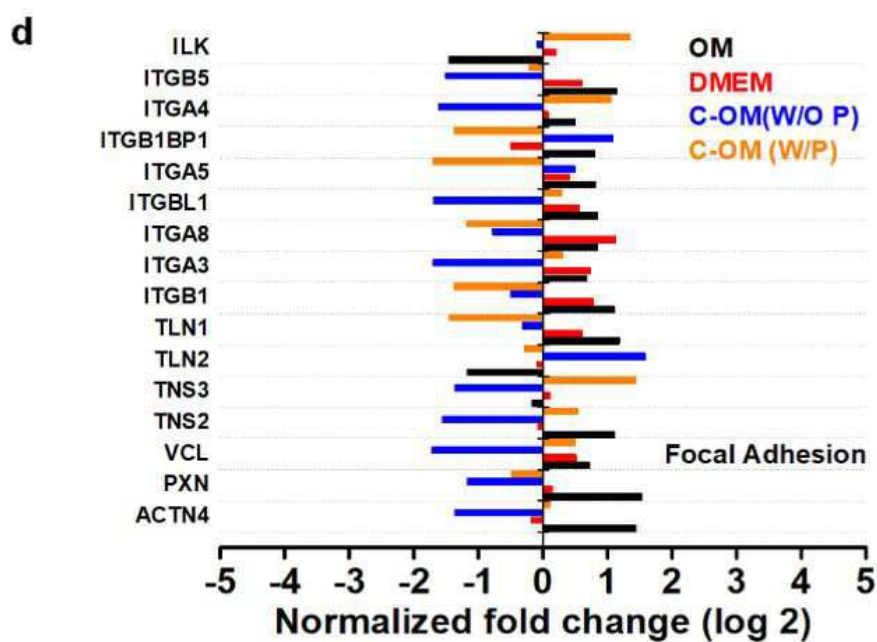
도면5b



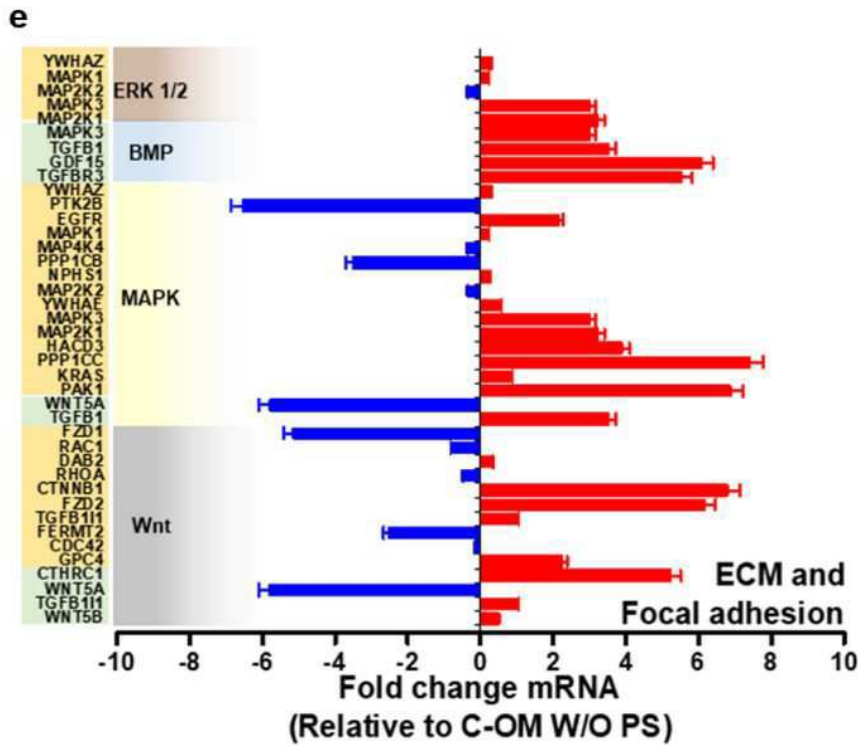
도면5c



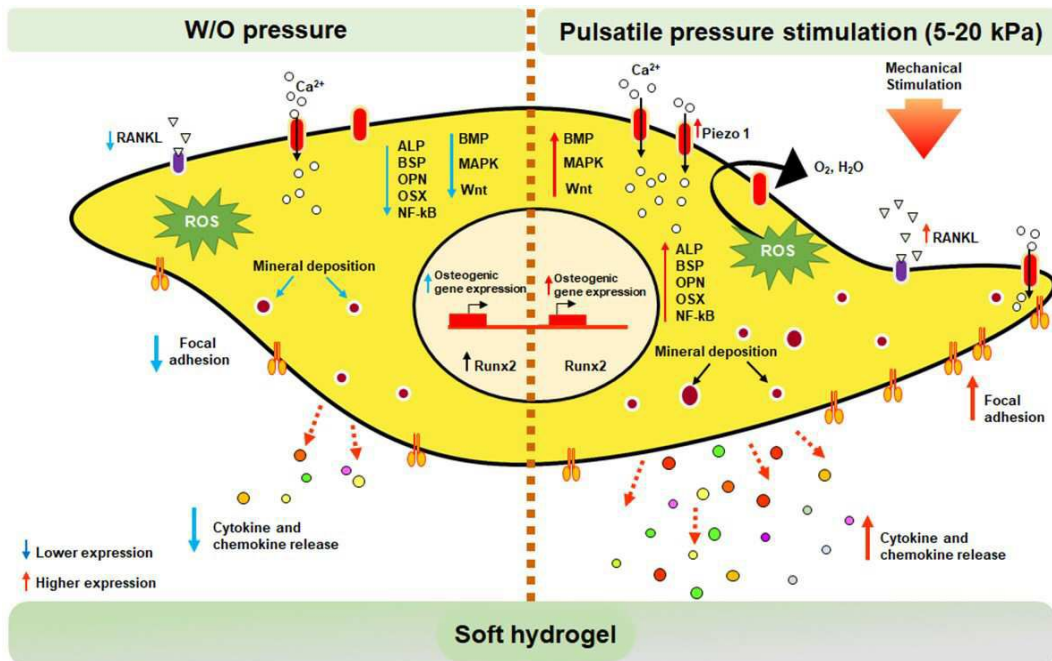
도면5d



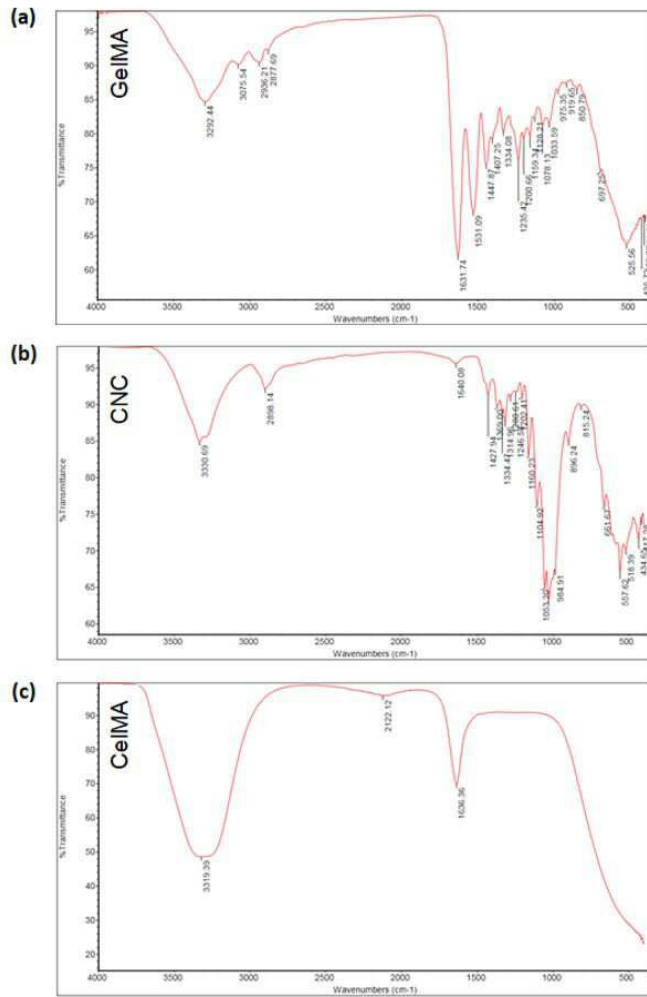
도면5e



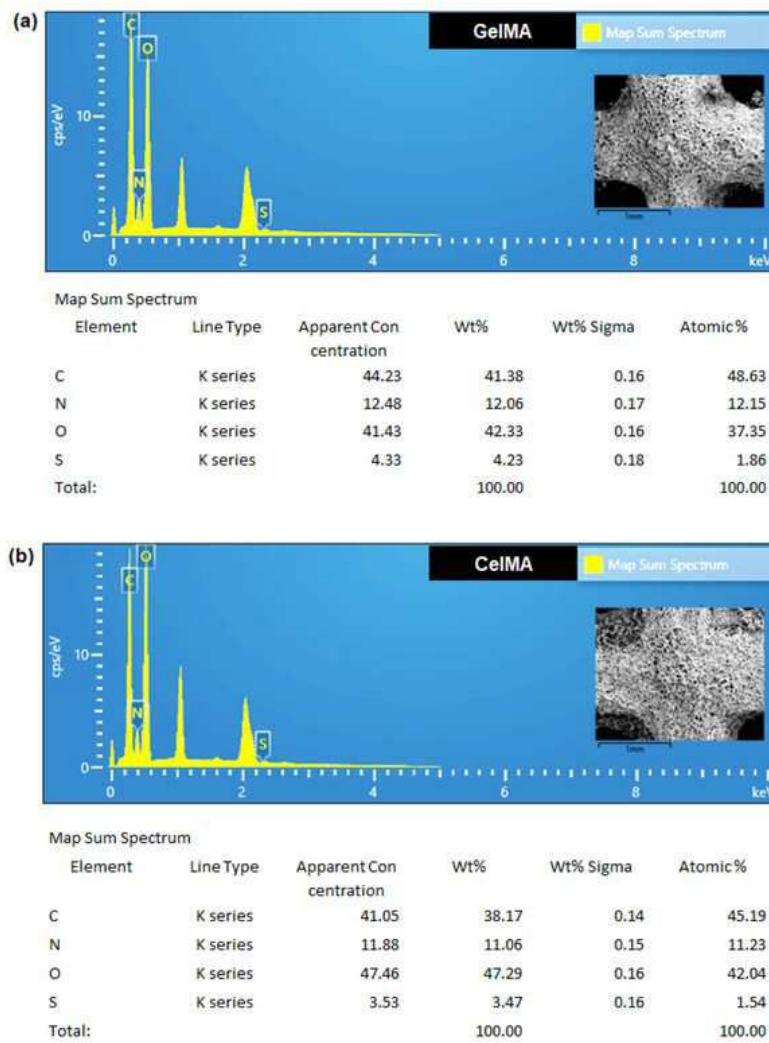
도면6



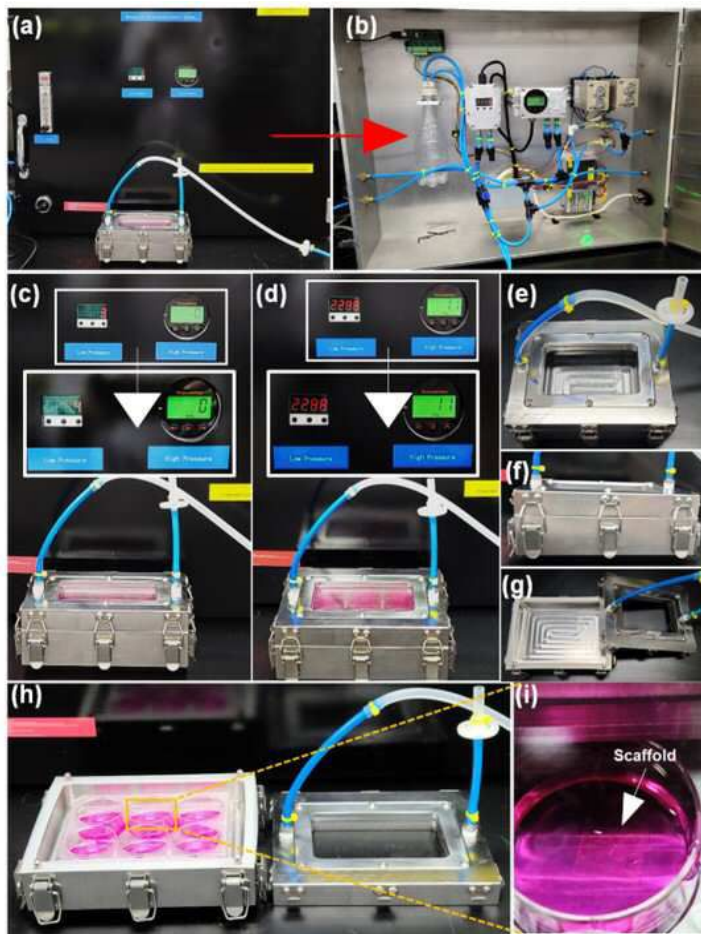
도면8



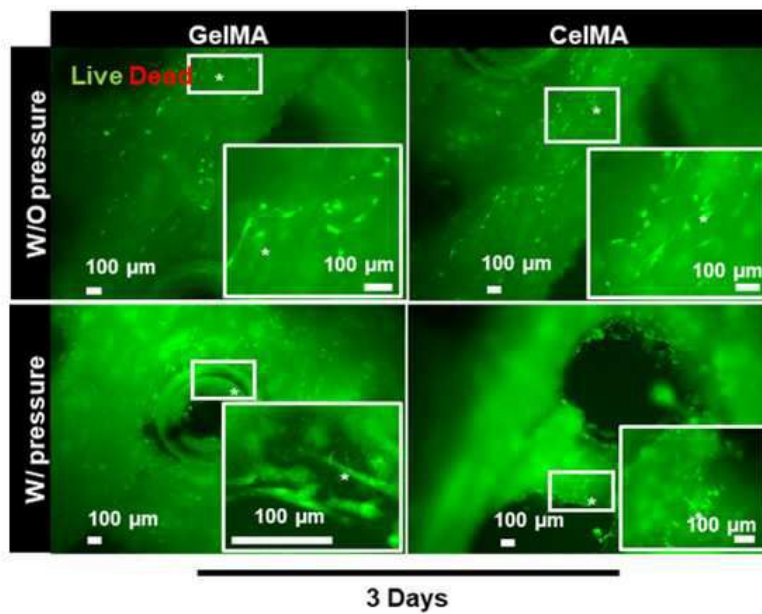
도면9



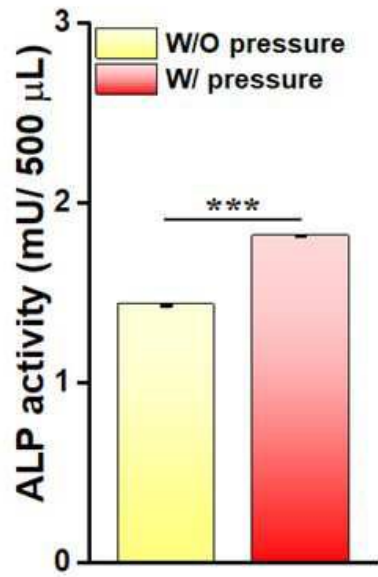
도면10



도면11



도면12



도면13

