(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월01일
(11) 등록번호 10-2680222
(24) 등록일자 2024년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) *C12M 1/34* (2006.01)
C12N 13/00 (2017.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 35/02 (2013.01)
C12M 41/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0008586
(22) 출원일자 2022년01월20일
심사청구일자 2022년01월20일
(65) 공개번호 10-2023-0112790
(43) 공개일자 2023년07월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR101952761 B1*
KR1020120139399 A*
WO2018132071 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
강원대학교 산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
임기택
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트 112동 2308호
뎁 두타 사얀
강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 206호
강글리 케야
강원특별자치도 춘천시 강원대학길 1, 농업생명과학대학 1호관 307동 206호 (효자동)
(74) 대리인
구현서

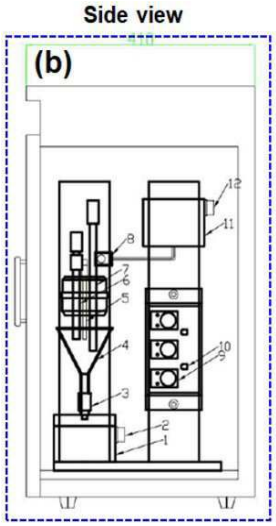
전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 권혁성

(54) 발명의 명칭 **줄기세포배양 증진을 위한 자극 기술 모델 기반 바이오리액터시스템 및 이의 응용**

(57) 요 약

본 발명은 a) 줄기세포배양용 생체자극 기반 바이오리액터 챔버;상기 챔버 내부에는 로킹(rocking) 모션 시스템, 세포의 배양환경을 제어하기 위한 센서, 배양배지의 상태 모니터링 센서, 배지의 공급부, 사용된 배지의 폐기부, 및 배지의 일정한 공급과 배출을 담당하기 위한 펌프를 포함하고, b) 상기 챔버와 연결된 펄스형 전자기장(pulse electro-magnetic) 시스템; 및 c)세포배양의 자동제어 및 실시간 상태 모니터링이 가능하도록 상기 챔버 외부에서 제어할 수 있는 제어부;를 포함하는 줄기세포배양 증진을 위한 자극기술모델기반 바이오리액터 및 그 응용에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
C12M 41/34 (2013.01)
C12M 41/46 (2013.01)
C12N 13/00 (2013.01)
C12N 5/0668 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1425158674
과제번호 S2840309
부처명 중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원
연구사업명 창업성장기술개발사업 디딤돌
연구과제명 줄기세포배양 증진을 위한 자극기술 모델 기반 바이오리액터시스템 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 주식회사 바이오메카젠
연구기간 2020.07.01 ~ 2021.10.30
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 65/100
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
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

a) 줄기세포배양용 생체자극 기반 바이오리액터 챔버;

상기 챔버 내부에는 로킹(rocking) 모션 시스템,

세포의 배양환경을 제어하기 위한 센서,

배양배지의 상태 모니터링 센서,

배지의 공급부,

사용된 배지의 폐기부, 및

배지의 일정한 공급과 배출을 담당하기 위한 펌프를 포함하고,

b) 상기 챔버와 연결된 펄스형 전자기장(pulse electro-magnetic) 시스템; 및

c)세포배양의 자동제어 및 실시간 상태 모니터링이 가능하도록 상기 챔버 외부에서 제어할 수 있는 제어부;

를 포함하는 줄기세포배양 증진을 위한 자극기술모델기반 바이오리액터 내부에 세포에 위치시키고, 펄스형 전자기 자극과 로킹(rocking) 모션을 동시에 수행하고,

상기 로킹 모션은 35rpm, 펄스형 전자기 자극은 1일 30분간 수행한 것을 특징으로 하는 상기 세포에서 오스테오칼신(OCN) 유전자의 발현을 증가시키는 방법.

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 줄기세포배양 증진을 위한 자극기술모델 기반 바이오리액터시스템 및 이의 응용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 줄기세포 치료는 여러 질병, 특히 골조직 관련 질병의 치료를 목적으로 하는 재생의학 및 세포 기반 치료 분야에서 오늘날 엄청난 주목을 받고 있다.

[0003] 그러나 인간 골수유래 간엽줄기세포(hBMSCs)의 대규모 증식 배양으로 인해 줄기세포 기반 치료제의 실용화에 어려움을 겪고 있다. hBMSC 배양의 현재 전략에는 세포를 증식시키기 위한 성장 보충제가 있거나 없는 2차원(2D) 플랫폼의 기존 세포 배양이 포함된다. 임상 적용에는 수십억 개의 세포가 필요하며 전통적인 정적 배양 시스템이 부적합하다는 것은 분명하다.

[0004] 반면에 동적 배양 시스템은 세포가 빠르고 효율적으로 성장할 수 있는 기본 미세 환경을 선호한다. 마이크로캐리어 기반 기술은 훨씬 더 큰 표면적을 제공할 뿐만 아니라 확장성, 유연성 및 세포 성장에 대한 정확한 제어를 향상시켰다. 또한, 생물물리학적 자극을 통한 동적 세포 배양의 통합 전략은 증식 및 분화 동안 세포 간 통신을 연구할 수 있는 많은 기회를 제공할 것이다.

[0005] [선행 특허 문헌]

[0006] 대한민국 특허 공개번호 10-2004-0028700(2004년04월03일)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 펄스 전자기장 자극이 있는 파동 생물반응기 시스템을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 펄스 전자기장 자극이 있는 파동 생물 반응기 시스템의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은

[0010] a) 줄기세포배양용 생체자극 기반 바이오리액터 챔버;

[0011] 상기 챔버 내부에는 로킹(rocking) 모션 시스템,

[0012] 세포의 배양환경을 제어하기 위한 센서,

[0013] 배양배지의 상태 모니터링 센서,

[0014] 배지의 공급부,

[0015] 사용된 배지의 폐기부, 및

[0016] 배지의 일정한 공급과 배출을 담당하기 위한 펌프를 포함하고,

[0017] b) 상기 챔버와 연결된 펄스형 전자기장(pulse electro-magnetic) 시스템; 및

[0018] c)세포배양의 자동제어 및 실시간 상태 모니터링이 가능하도록 상기 챔버 외부에서 제어할 수 있는 제어부;

[0019] 를 포함하는 줄기세포배양 증진을 위한 자극기술모델기반 바이오리액터를 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 펄스형 전자기장(pulse electro-magnetic) 시스템은 0.001~100kHz의 주파수 범위에서 사인파, 삼각형, 사각 또는 램프(ramp) 파형을 생성할 수 있으며,

[0021] 상기 시스템은 전력 증폭기를 가지는 파형 함수 발생기, 상기 증폭기에 연결된 2축 자기장 센서, 및 헬름홀츠(Helmholtz) 코일로 이루어지고,

[0022] 신호는 상기 증폭기의 도움으로 코일로 전송되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 헬름홀츠(Helmholtz) 코일은 로킹(rocking) 플레이트의 탑(top)에 위치하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포의 배양환경을 제어하기 위한 센서는 온도, 습도, 및 CO_2 센서 중 하나 이상인 것이 바람직하고,

[0025] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 배양 배지의 상태 모니터링 센서는 pH, 용존산소(DO), 포도당 및 젖산(lactate) 센서 중 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 바이오리액터는 상기 배양 배지를 모으는 콜렉터(collector)를 포함하며, 사용된 배지에서 pH 및 포도당 및 젖산 수준을 측정하기 위해서 사용되며 사용된 배지는 배출부를 통하여 폐기되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0027] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 바이오리액터 내부에 세포에 위치시키고, 펄스형 전자기 자극과 로킹(rocking) 모션을 동시에 수행하여 상기 세포를 증식시키는 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 펄스형 전자기 자극은 5V, 0.62 mT인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0029] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 로킹 모션은 35rpm, 펄스형 전자기 자극은 1일 30분간 수행한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 세포는 줄기세포인 것이 바람직하고, 중배엽 줄기세포 (human mesenchymal stem cells)인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0031] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 바이오리액터 내부에 세포에 위치시키고, 펄스형 전자기 자극과 로킹(rocking) 모션을 동시에 수행하여 상기 세포에서 오스테오칼신(OCN) 유전자의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0033] 이하 본 발명을 설명한다.

[0034] 본 발명에서 본 발명자들은 전자기장 자극(EMF)과 지속적인 포도당 및 젖산 모니터링 시스템을 사용하여 hBMSC를 증대하기 위한 맞춤형 로킹 생물반응기 시스템을 개발했다. 이를 위해 hMSC를 다양한 EMF 노출(1V, 5V 및 10V-1Hz)에서 테스트하여 세포 증진에 대한 최대 생존 가능성을 찾았다(도 7).

[0035] 흥미롭게도, hMSC는 파동 배양 동안 집합체와 같은 구조를 형성하는 경향이 있다. 본 발명은 파동 배양(35rpm) 동안 10V-1Hz EMF 노출(자계: 5.82G)이 WST-8 분석에 의해 평가된 바와 같이 정적 배양보다 최대 15%까지 hMSC의 생존력을 유도한다는 것을 보여준다. 또한, 파동 생물 반응기에서 hMSC의 장기 세포 배양은 정적 배양과 비교했을 때 Runx2(6.8-8.0배), ALP(8.0배), BSP(5-6.0배) 및 OCN(8 -10.0배)과 같은 골형성 전사 인자의 발현을 현저하게 증가시켰다.

[0036] 본 발명은 또한 Six biosensor B.LV5에 의해 예측된 바와 같이 평균 포도당 소비가 정적 배양에 비해 상당히 높다는 것을 발견했다. 세포 배양의 초기 단계(포도당 농도 25.0mM/μL)에서 평균 검출 가능한 포도당 수준은 18.0mM/μL이고 젖산은 2.5mM/μL이다. 그러나 동적 배양 7일 후 배지의 가용 포도당은 약 2.6mM/μL로 추정되었고 젖산은 14.8mM/μL로 정적 대조군(각각 약 12.0mM/μL 및 1.8mM/μL)보다 유의하게 높았다. ,

[0037] RNA 시퀀싱 결과는 hMSC의 파동 배양 동안 주요 골형성/기계적으로 자극된 신호 전달 경로의 상향 조절을 추가로 나타낸다.

[0038] 이러한 결과는 10V-1Hz(5.82G) EMF의 사용이 hMSC에 대해 무독성이며 외부에서 제어되는 EMF로 파동 생물반응기를 변형하면 hMSC의 증식 및 증진에 대한 좋은 잠재력이 있음을 시사했다.

발명의 효과

[0039] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 EMF로 파동 생물반응기(bioreactor)를 변형하면 hMSC의 증식 및 증진에 대한 좋은 잠재력이 있음을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 줄기 세포 배양용 자극 기반 리액터 챔버의 (a, b) 단면(CS) 및 측면, (c, d) DO/pH 센서 및 (e) 외부 제어 장치의 설계 개략도 및 (f) 개발된 자극 기반 .

도 1에서 1:배수 통(drain off), 2: 배수 레벨 센서, 3: 배수 용액 센서, 4: 수집기(collector), 5: 레벨 센서, 6: 용존 산소 센서, 7: pH 센서, 8: 배지 흐름 펌프, 9: 미터링(Metering) 펌프, 10: 미니 미터링 펌프, 11: 버킷(bucket), 12: 배지 레벨 센서, 13: 공기 순환 팬, 14: 습도 센서, 15: 이산화 탄소 센서, 16: TFT LCD 스크린 콘트롤, 17: 가스 흐름 미터,

도 2는 연속 포도당 모니터링 시스템이 있는 파동 생물 반응기의 작동 원리를 나타낸 그림으로, 펄스 전자기(EMF) 자극 시스템(a)과 외부 EMF 발생기(b)가 연결된 설계된 생물반응기의 디지털 사진. 생물 반응기는 내부 CO2, 온도, 용존 산소(DO) 및 pH를 확인하기 위해 TFT LCD 화면 제어(c)와 연결된다.

각각 정적(d), 락킹(rocking) 운동(e, f) 및 EMF 자극과 함께 락킹(g)에서 세포 배양에 대한 그림적 표현. 배양액은 장치 측면에 위치한 DO/pH 원뿔형 수집기(h)를 통해 수집하여 pH 및 포도당/젖산 농도 측정에 사용하고, (i) 사용한 배지에서 최종적으로 폐기하였다.

도 3(a) 생물 반응기 챔버 내부의 p-EMF 장치 설정 및 EMF 자극에 대한 개략도. (1) Helmholtz 코일을 로커 플레이트의 상단에 놓고 요동 배양 동안 균형을 유지하기 위해 덕트 테이프를 사용하여 고정했다. (2) 코일은 EMF에 대해 다른 파면을 생성하는 외부 증폭기와 연결됨. (3) PASCO Capstone 소프트웨어를 사용하여 출력 데이터를 평가.

(b) 72시간 동안 생물 반응기 챔버 내부의 온도를 지속적으로 모니터링함.

(c) 표시된 시간 간격으로 hBMSC의 정적 배양 동안 pH 및 용존 산소(DOO) 모니터링.

도 4는 파동 생물 반응기 시스템에서 hBMSCs 증진 배양을 나타낸 그림으로,

(a) 표시된 시간 간격에서 다양한 자극 조건이 있는 경우의 세포 성장 곡선. 정적 배양과 비교하여 hBMSC가 35rpm 로킹 조건에서 배양되었을 때 상당한 차이가 관찰됨.

(b) 표시된 배양 조건에서 세포 배양 14일 후 골형성 관련 유전자 마커의 유전자 발현 프로파일.

(c) 표시된 시간 간격으로 다양한 배양 조건에서 hBMSC의 대표적인 Alizarin Red-S 염색. 데이터는 삼중 실험의 평균 ± S.D임. *p < 0.01 및 *p < 0.001에서 통계적 유의성(One-way ANOVA 테스트).

도 5(a) 배양 7일 후 hBMSC의 대표적인 라이브/데드 염색. 스케일 바: 100 μm.

(b) 배양 3일 후 정적 및 동적 EMF 자극에서 OCN 마커의 발현을 보여주는 hBMSC의 CLSM 영상화. 배율 ×200 및 ×400.

(c) 표시된 시간 간격에서 hBMSC의 파동 생물 반응기 배양 중 대표적인 포도당 소비.

(d) 표시된 시간 간격에서 hBMSC의 파동 생물 반응기 배양 중 대표적인 젖산 생산. 데이터는 삼중 실험의 평균 ± S.D임. *p < 0.05에서 통계적 유의성(One-way ANOVA 테스트).

도 6은 골형성과 관련된 유전자의 상향 조절 및 하향 조절을 보여주는 다양한 조건의 락킹 및/또는 EMF 자극에서 hBMSC의 전사체 분석을 나타낸 그림으로,

(a) 다른 조건에서 중요한 유전자의 2차원 계층적 클러스터링.

(b-e) hBMSCs의 락킹 운동 배양 하에서 골 형성 신호 동안 주요 상향 조절 및 하향 조절 유전자의 비교를 위한 산점도.

(f) 각각 정적, 동적, 동적 + MF 및 동적 + EMF 배양 사이에서 특이적 또는 공통적으로 차등적으로 발현된 유전자를 나타내는 벤 다이어그램.

도 7(a) P407 및 EMF 자극을 사용한 세포 인쇄의 개략도. (b) 1 V, 0.14 mT EMF, (c) 5 V, 0.62 mT EMF 및 (d) 10 V, 1.21 mT EMF에서 지정된 시간 간격으로 WST-1 분석에 의한 세포 함유 3D 구성물의 세포독성 평가. (e) 표시된 시간 간격(스케일 막대: 100mm)에서 EMF로 자극된 SCAP의 대표적인 형광 현미경 이미지. 데이터는 3회 반복 실험의 평균 SD이며 *p < 0.05에서 통계적 유의성.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0042] 실시예 1: 생물반응기 설계 및 성능

[0043] 생물 반응기는 펄스 전자기장(p-EMF) 자극이 있는 상태에서 줄기 세포에 동적 환경을 제공하기 위해 특별히 개발되었다. 전자기장 자극은 hBMSCs 증식 및 골형성 분화를 촉진하는 것으로 나타났다. 생물 반응기 챔버는 도 1(a, b)와 같이 높이가 710mm이고 너비가 540mm인 스테인리스 스틸 챔버로 구성되어 있다. 로킹 모션 시스템은 줄기 세포에 대한 동적 배양 조건을 제공하기 위해 반응기 내부에 통합되어 있다.

[0044] 생물 반응기에는 세포 증진 배양 중 배지 pH의 변화를 모니터링하기 위한 실시간 DO/pH 감지 장치(500 × 300mm)가 있는 자동화된 배지 흐름 제어도 제공된다(도 1c-d). 마지막으로 반응기는 반응기 외부에서 제어할 수 있는 터치 스크린 TFT LCD 디스플레이와 연결된다(도 1e).

[0045] 생물 반응기에는 온도 및 CO2 가스 흐름 시스템에 대한 실시간 제어가 제공되어 기본 BOD 인큐베이터와 정확히 동일한 환경을 모방한다. 세포 배양 절차가 있는 생물 반응기 시스템의 디지털 사진은 도 2에 나와 있다.

[0047] 실시예 2: p-EMF 장치 설정 및 성능

[0048] EMF 자극에는 PASCO 850 범용 인터페이스(PASCO, California, USA)가 사용되었다.

[0049] 이 장치는 0.001~100kHz의 주파수 범위에서 사인파, 삼각형, 사각 및 램프(DC 오프셋 포함)를 포함한 다양한 파형을 생성할 수 있다. 이 장치는 파형 함수 발생기(15W)와 전력 증폭기(PASCO Power Amplifier-II, CI-6552A, 1A에서 최대 ±10V 피크), 2축 자기장 센서(MF 센서; PS-2162, PASCO Scientific, 범위 ±1000G, 최대 샘플 속도 1000Hz) 증폭기에 연결, 20cm 간격으로 배치된 2개의 Helmholtz 코일. 각 Helmholtz 코일은 내부 및 외부 반경이 각각 10.06 및 11.37 cm인 구리 와이어(직경 0.64mm, 500회)로 만들어진다. 각 코일은 외부 손상을 방지하기 위해 폴리카보네이트 플라스틱 멤브레인으로 싸여 있다.

[0050] 신호는 증폭기의 도움으로 코일로 전송되었다. EMF 및 MF 센서를 생성하는 코일은 5% CO2 인큐베이터 내부에 배치되었다. MF 센서에는 서로 수직으로 향하고 센서의 프로브 끝에 위치한 두 개의 고유한 홀 효과 장치가 있다.

[0051] 본 발명에서 본 발명자들은 생물 반응기 내부의 축 자기장을 측정하기 위해 두 코일 사이에 MF 센서를 수직으로 배치했다. 실험 절차는 도 3에 개략적으로 나와 있다.

[0053] 실험예

[0054] 본 발명의 실험에 사용된 인간 치조골 유래 중간엽 줄기세포(hBMSCs)는 대한민국 서울대학교 한국세포주은행에서 입수했다. DMEM, 소태아혈청(FBS), 1% P/S, 인산완충식염수(PBS)는 대한민국 Welgene에서 구입했다. RNAzol, Live-Dead 염색 키트, F-액틴 프로브는 미국 Sigma-Aldrich에서 구입했다. WST-1 세포 생존력 분석 키트는 대한민국 도젠바이오로부터 입수하였다. PrimerScript™ RT 키트와 SYBR 녹색 qRT-PCR 마스터 믹스는 일본 TaKaRa Bioscience에서 구입했다.

[0055] 오스테오칼신(OCN)에 대한 1차 및 2차 항체는 미국 Santa Cruz Biotechnology에서 구입했다. 포도당/젖산 모니터링 시스템을 갖춘 맞춤형 파동 바이오리액터 시스템은 한국 Lee-Chun Electronics Ltd.에서 구입했다. 시험관내 포도당 및 젖산 분석 키트는 대한민국 DoGenBio에서 구입했다.

[0057] 실험예 1: hBMSC 배양

[0058] hBMSC는 5% CO_2가 포함된 37° C의 가습 분위기에서 10% FBS 및 1% P/S를 포함하는 DMEM 배지에서 유지되었다.

hBMSC의 계대-3 또는 계대-4를 증진 배양 연구에 사용했다.

[0060] 실험예 2:. 배양 조건 및 EMF 장치 설정 최적화

[0061] hBMSCs 증진 배양의 경우, 세포(5×10^5)를 $25mm^3$ 플라스크에서 35rpm(30분/일)으로 20-25일 동안 배양했다. 정적 배양 그룹은 각각 대조군 세트로 간주되었다. 전자기장(EMF) 자극의 경우, EMF 자극 유무에 관계없이 위에서 언급한 것과 동일한 조건에서 세포를 배양하였다. 실험 그룹은 각각 (1) 정적 배양 그룹, (2) 동적 배양만, (3) 동적 + MF만, (4) 동적 + EMF이다. 세포 성장을 격일로 모니터링하고 도립 광학 현미경(Zeiss, Germany)을 사용하여 사진을 찍었다. 생사 분석을 위해 세포를 PBS로 세척하고 37° C에서 5-10분 동안 10 μL의 L/D 염료와 함께 인큐베이션했다. 그 후, 세포는 적절한 필터를 갖춘 도립형광현미경(Leica, Germany)을 사용하여 사진을 찍었다.

[0063] 실험예 3: 시험관내 골형성 분화

[0064] 골형성 분화를 위해, hBMSC를 각각 50㎍/mL L-아스코르브산, 10mM β-글리세로포스페이트 및 100nM 덱사메타손이 보충된 DMEM을 함유하는 골형성 유도 배지에서 배양하였다. 증식 배양 21일 후, 세포를 PBS로 2회 세척하고, 70% ice-cold 에탄올로 고정하고, 40mM alizarin Red-S 염색(pH 4.2)으로 1분간 염색하고, 결절 형성을 디지털 카메라를 이용하여 촬영하였다.

[0065] 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 위해 RNAzol 시약으로 세포를 수확하고 제조업체의 지침에 따라 총 RNA를 추출했다. 골형성 유전자 마커(Runx2, ALP, OCN, BMP-2)에 대한 qRT-PCR은 이전 연구에서 보고된 바와 같이 CFX96 Maestro Real-Time 시스템(Bio-Rad, USA)을 사용하여 수행되었다[Dutta SD, Bin J, Ganguly K, Patel DK, Lim K-T. Electromagnetic field-assisted cell-laden 3D printed poloxamer-407 hydrogel for enhanced osteogenesis. RSC Advances 2021;11:20342-54;Dutta SD, Patel DK, Seo Y-R, Park C-W, Lee S-H, Kim J-W, et al. In vitro biocompatibility of electrospun poly (ε-caprolactone)/cellulose nanocrystals-nanofibers for tissue engineering. Journal of Nanomaterials 2019;2019].

[0067] 실험예 4: 세포골격 및 OCN 발현 연구

[0068] 세포골격 형태 및 OCN 단백질 마커 발현은 증진 배양 3일 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)에 의해 평가되었다. 이를 위해 3.7% paraformaldehyde(PFA, Sigma, USA)와 0.1% Triton-X 100을 이용하여 세포를 고정하고 투과화시켰다. 이후 1% BSA를 이용하여 1시간 동안 세포를 차단한 후 PBS로 세척하였다. 차단 후 세포를 OCN에 대한 1차 항체와 함께 배양한 다음 Alexa-Flour 488이 결합된 2차 항체와 1시간 동안 배양했다. 다음으로, 세포를 F-액틴 레드로 염색하고 DAPI로 대조염색하여 F-액틴 및 핵을 시각화하였다. 세포는 초고해상도 CLSM(Zeiss, Germany)을 사용하여 촬영되었고 이미지는 ZEN 소프트웨어(v1.8, Zeiss, Germany)로 분석되었다.

[0070] 실험예 5: 세포 대사 산물 분석

[0071] 포도당, 젖산염, pH 및 용존 산소(DO)와 같은 세포 대사 관련 구성 요소는 다양한 배양 조건에서 내장된 포도당/젖산염 및 pH/DO 센서를 사용하여 모니터링했다. 포도당/젖산 센서의 정확도를 평가하기 위해 포도당/젖산 분석 키트(DoGenBio, 대한민국)를 통해 사용된 배지의 포도당과 젖산 수준도 각각 확인했다.

[0072] 실험예 6: 전사체 분석

[0073] 다양한 실험군에서 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 평가하기 위해 전사체 분석을 수행하였다. 이를 위해 RNAzol 시약으로 증진 배양 7일 후 총 RNA를 수확하여 표준 RNA 라이브러리를 제작하는데 사용하였다.

[0074] 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 $\log_2$(각 그룹의 정규화된 데이터 평균)로 정규화되었고 통계 분석은 Student's t-test를 사용하여 수행되었다.

[0076] 상기 실험예의 결과를 하기에 기술한다.

[0077] hBMSC 증진 배양을 위한 p-EMF 최적화

[0078] p-EMF 자극은 hBMSCs 증식에 대한 EMF와 락킹 운동의 결합된 효과를 평가하기 위한 목적으로 적용되었다. 5.82 ± 0.22G의 평균 자기장을 생성하는 5V-10Hz p-EMF 자극은 hBMSC의 생물 반응기 배양을 위해 신중하게 선택된다. 각 배양 플라스크 또는 배양 플레이트에 하루 30분 동안 5V-1Hz p-EMFs 자극을 가하고 동일한 조건을 사용하여 원하는 시간 동안 골형성 유도 배지에서 세포를 분화시켰다.

표 1

[0079]

Sl. No.	그룹	p-EMFs 자극	Rocking motion (35 rpm)	자극 시간
1	Static	No	No	No
2	Dynamic	No	Yes	30 min/day
3	Dynamic + MFs	Only MFs (No EMFs)	Yes	30 min/day
4	Dynamic + EMFs	Yes	Yes	30 min/day

[0080] 표 1은 hBMSC의 p-EMF 배양을 흔들기 위한 실험 절차의 개요를 나타낸다. 표에서 MFs: Magnetic fields, EMFs: Electro-magnetic fields를 의미함.

[0081] 도 4는 hBMSCs 증진 및 분화에 대한 동적 p-EMF 자극의 효과를 보여준다. 도 4a에 도시된 바와 같이, hBMSC의 수는 다른 처리군과 비교하여 동적 + EMF 배양(*p < 0.05)에서 유의하게 향상되었으며, 이는 p-EMF를 사용한 동적 배양 조건이 hBMSC 증식에 심오한 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[0082] 더욱이, ALP, OCN 및 BMP-2와 같은 골형성 유전자 마커 발현은 동적 + EMF 배양 후에 유의하게 증가되었으며(도 4b), 이는 결합된 전략이 줄기 세포 치료 및 재생 의약을 위해 hBMSC를 분화하기 위해 적용될 수 있음을 뒷받침한다

[0083] 미네랄 유도 전위를 평가하기 위해 hBMSC의 ARS 염색을 수행했으며 그 결과는 도 4c에 나와 있다. 특히, 광물화된 결절 형성은 대조군보다 동적 + EMF 조건에서 더 높았으며, 이는 자극된 조건에서 더 나은 골형성 잠재력을 나타낸다.

[0085] hBMSC의 세포 형태, 골 형성 및 대사 변화 평가

[0086] 도 5a는 다양한 조건에서 배양 7일 후 hBMSC의 Live-Dead 염색 이미지를 보여준다. 특히, 처리된 조건 중 어느 것도 배양된 hBMSC에 독성이 발견되지 않았고 세포 수는 동적 + EMF 자극의 존재하에 더 높은 것으로 발견되었다.

[0087] OCN과 같은 골형성 단백질 마커 발현은 정적 및 동적 + EMF 조건 모두에서 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 평가되었으며 결과는 도 5b에 나와 있다.

[0088] 흥미롭게도, OCN의 발현은 static 그룹보다 dynamic + EMF 처리된 세포에서 유의하게 증가하였다. 더욱이, 액틴 배열은 또한 Dynamic + EMFs 배양 조건의 존재 하에서 변화하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 hBMSC의 형태 형성에서의 역할을 나타낸다.

[0089] 다음으로, 우리는 hBMSCs의 락킹 배양 동안 포도당 소비와 젖산 생산의 효과를 확인했다. 도 5c는 다양한 배양 조건에서 hBMSC의 시간 의존적 포도당 소비를 보여준다. p-EMF 매개 동적 배양은 세포가 정적 그룹보다 대사적으로 매우 활발하기 때문에 더 많은 포도당을 고갈시킨다는 점에 주목하는 것이 흥미로웠다.

[0090] 유사하게, 젖산 축적은 p-EMF 매개 동적 배양의 존재에서 더 높게 발견되었으며(도 5d), 이는 hBMSC의 동적 배양이 로킹 배양 하에서 정적 배양 그룹보다 더 많은 젖산염을 산출함을 나타낸다.

[0092] hBMSC의 전사체 분석

[0093] hBMSC의 로킹 배양과 관련된 전체적인 전사체 변화는 RNAseq 기술에 의해 측정되었다.

[0094] 이를 위해 본 발명자들은 골형성 분화 배지에서 7일 동안 다양한 조건에서 hBMSC를 배양했다. 이후 total RNA isolation kit를 이용하여 total RNA를 추출하고 Nanodrop(Thermo-Fischer Scientific, USA)을 이용하여 시료의 품질을 평가하였다.

[0095] 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.

[0096] 원시 데이터는 log2(각 그룹의 정규화된 데이터 평균)로 정규화되었고 통계 분석은 Student's t-test를 사용하여 수행되었다.

[0097] Z-점수가 있는 2차원 계층적 유전자 클러스터링 맵은 도 6a에 나와 있다. 25737개의 유전자 중 약 805개의 유전

자가 차별적으로 발현되었으며, 다양한 배양 조건에서 hBMSC의 골형성 분화 동안 상당한 변화를 보였다.

[0098] 중요하게도, 핵 전사 인자인 PCNA는 정적(2.29배), 동적(2.85배), 동적+MF 그룹(2.9배)과 비교하여 각각 동적 + EMF 처리군(27.89배)에서 높게 발현된다. 더욱이, EIF2B4 발현은 또한 hBMSC의 동적 EMF 배양(2.29배) 동안 상향조절되었는데, 이는 동적 p-EMF 배양이 정적 배양보다 더 많은 세포 증식 기능 및 분화 잠재력을 나타냈다는 것을 시사한다.

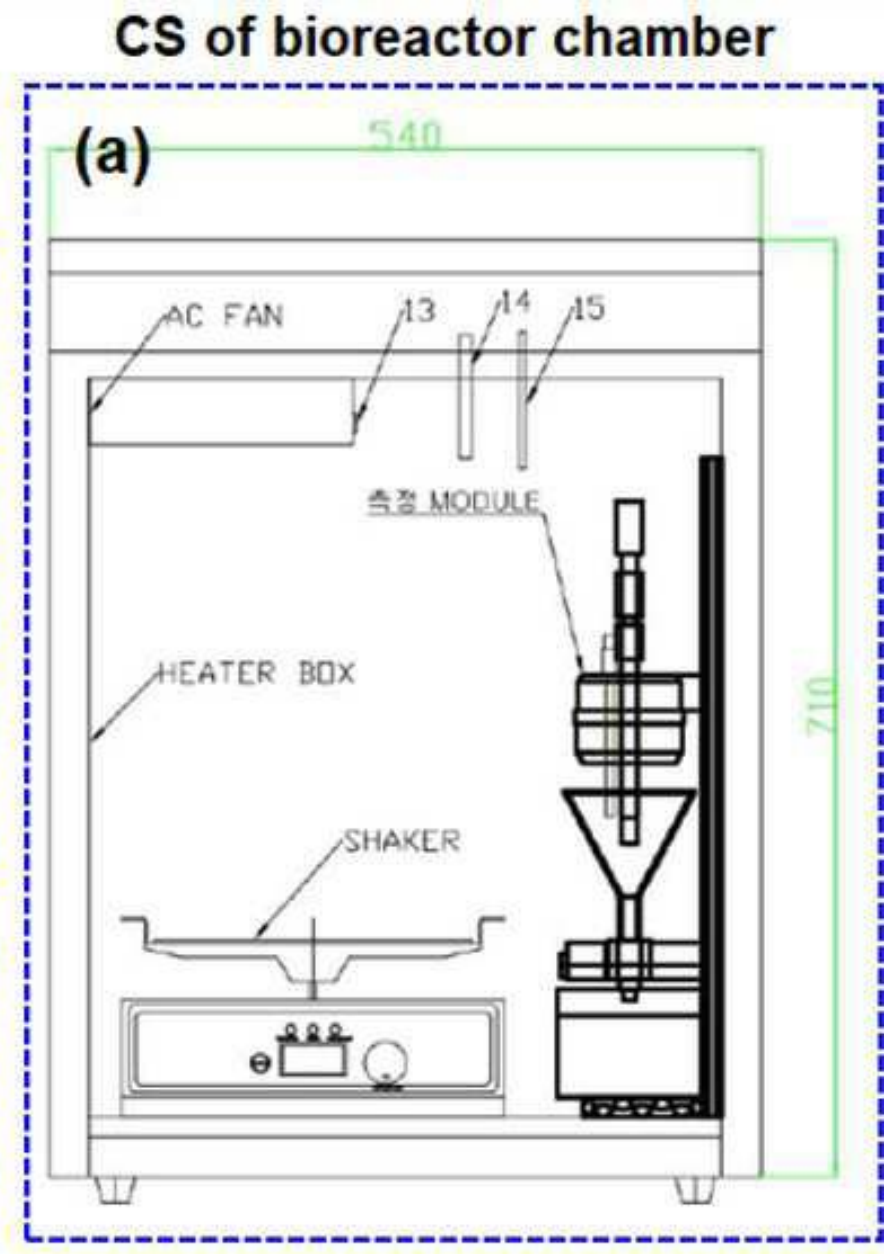
[0099] 도 6b-e는 정적/동적, 동적/동적 +MF, 정적/동적 + EMF 및 동적/동적 + EMF를 각각 비교할 때 다양한 조건에서 차등적으로 발현된 유전자(DEG)의 산점도를 보여준다. 정적 배양과 비교하여 동적 + EMF 배양에서는 71개의 유전자가 상향 조절되고 38개의 유전자가 하향 조절되는 것으로 나타났다.

[0100] 흥미롭게도, 동적 대 동적 + MF 그룹 간에 비교할 때 상향 또는 하향 조절된 유의미한 유전자가 없었고, 이것은 p-EMF 매개 동적 배양이 다른 처리 그룹보다 더 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 나타낸다는 것을 의미한다(그림 6f).

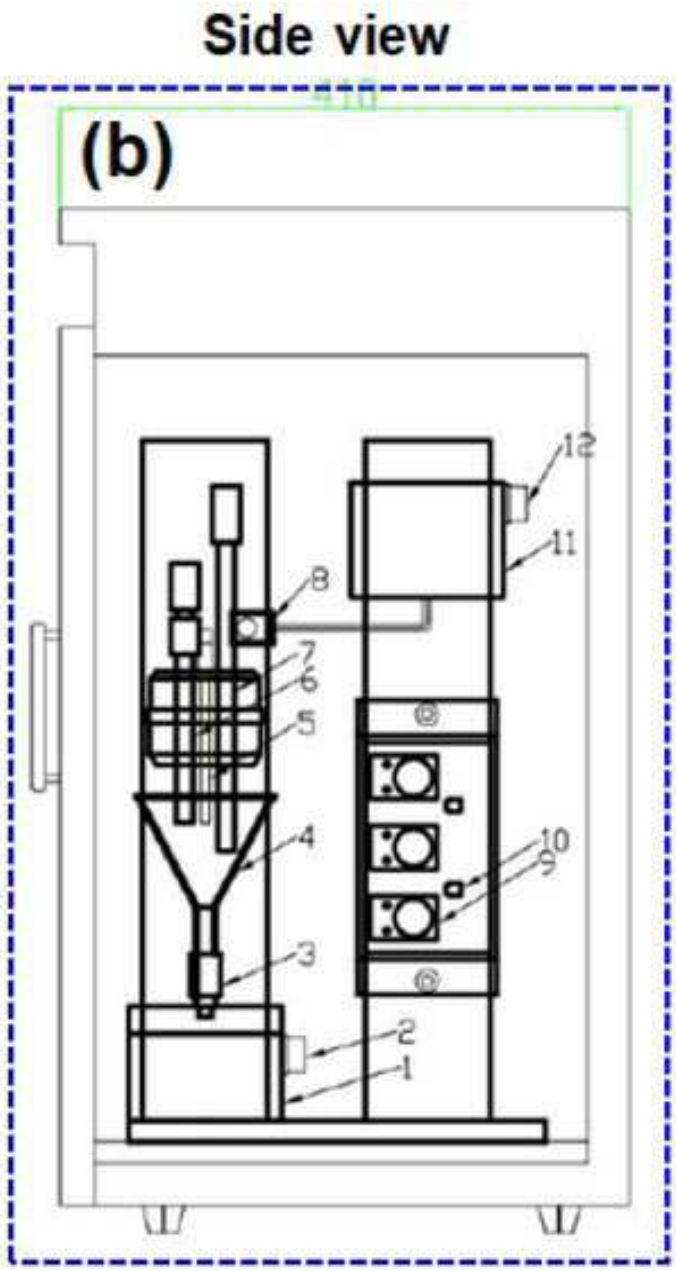
[0101] 특히, 다른 처리 조건 간에 비교할 때 총 155개의 유전자가 하향 조절되고 426개의 유전자가 상향 조절되어 hBMSC의 동적 p-EMF 자극이 정적 배양보다 대사적으로 활성임을 나타낸다.

도면

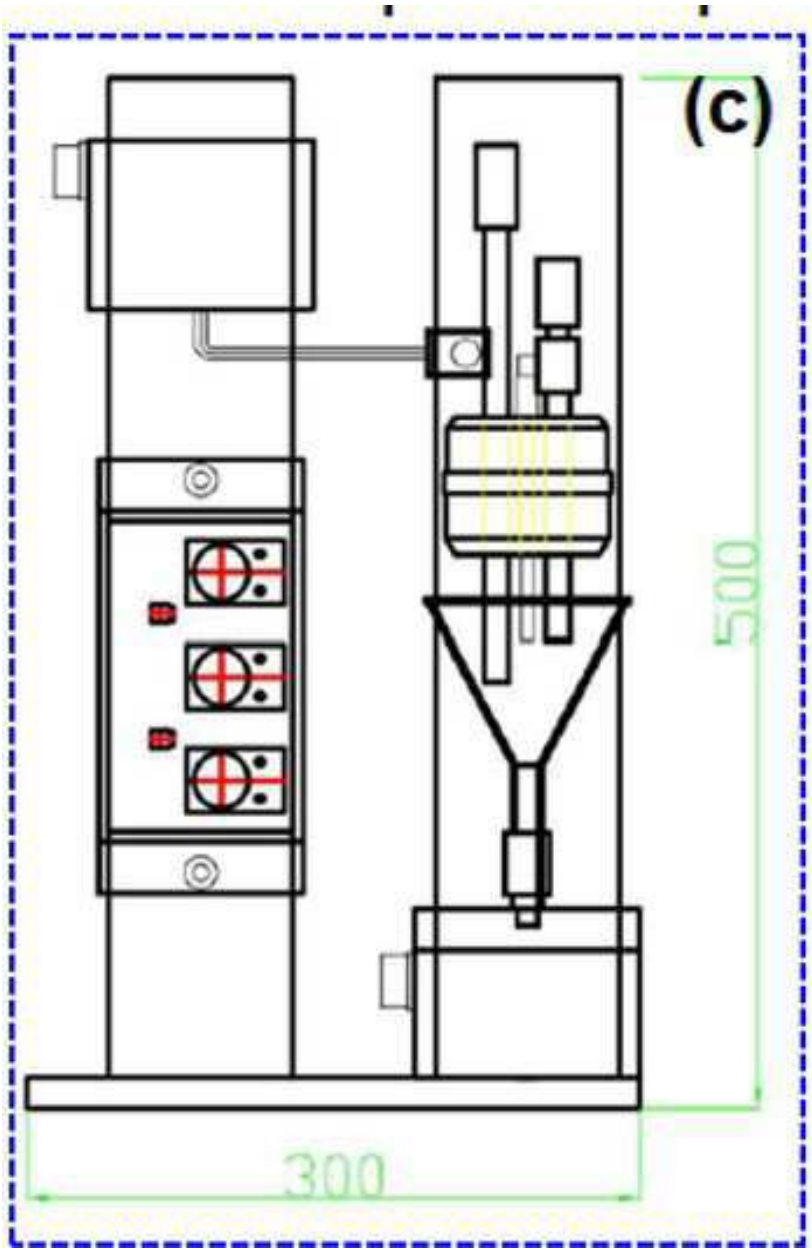
도면1a


CS of bioreactor chamber
(a)
540
710
AC FAN
13
14
15
측정 MODULE
HEATER BOX
SHAKER

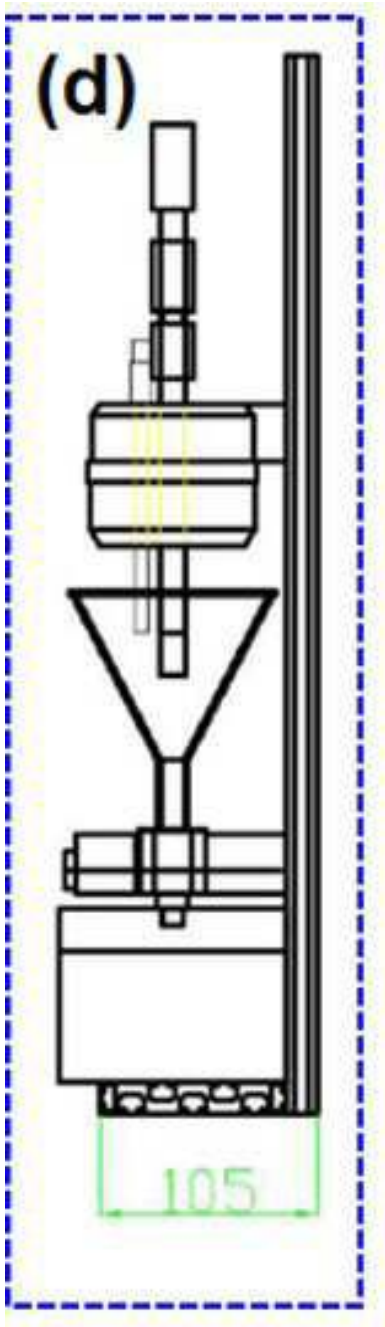
도면1b



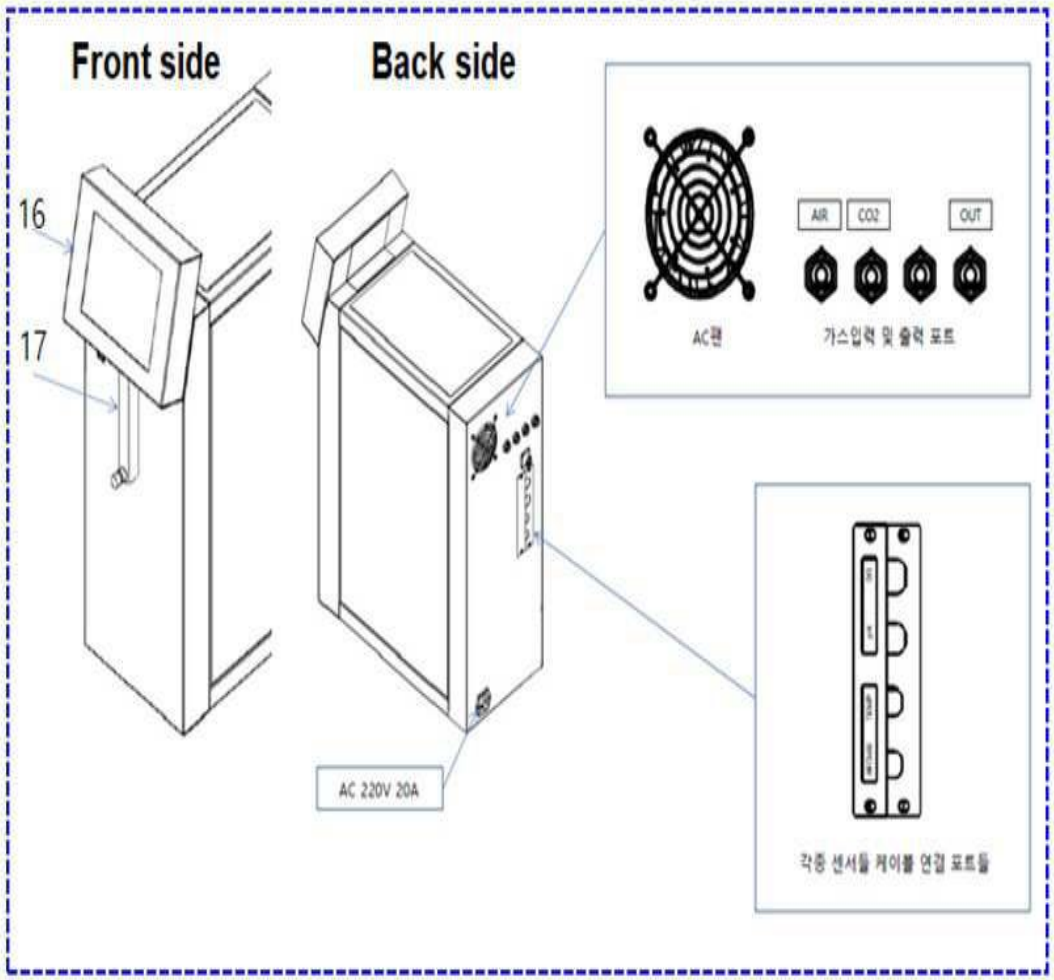
도면1c



도면1d

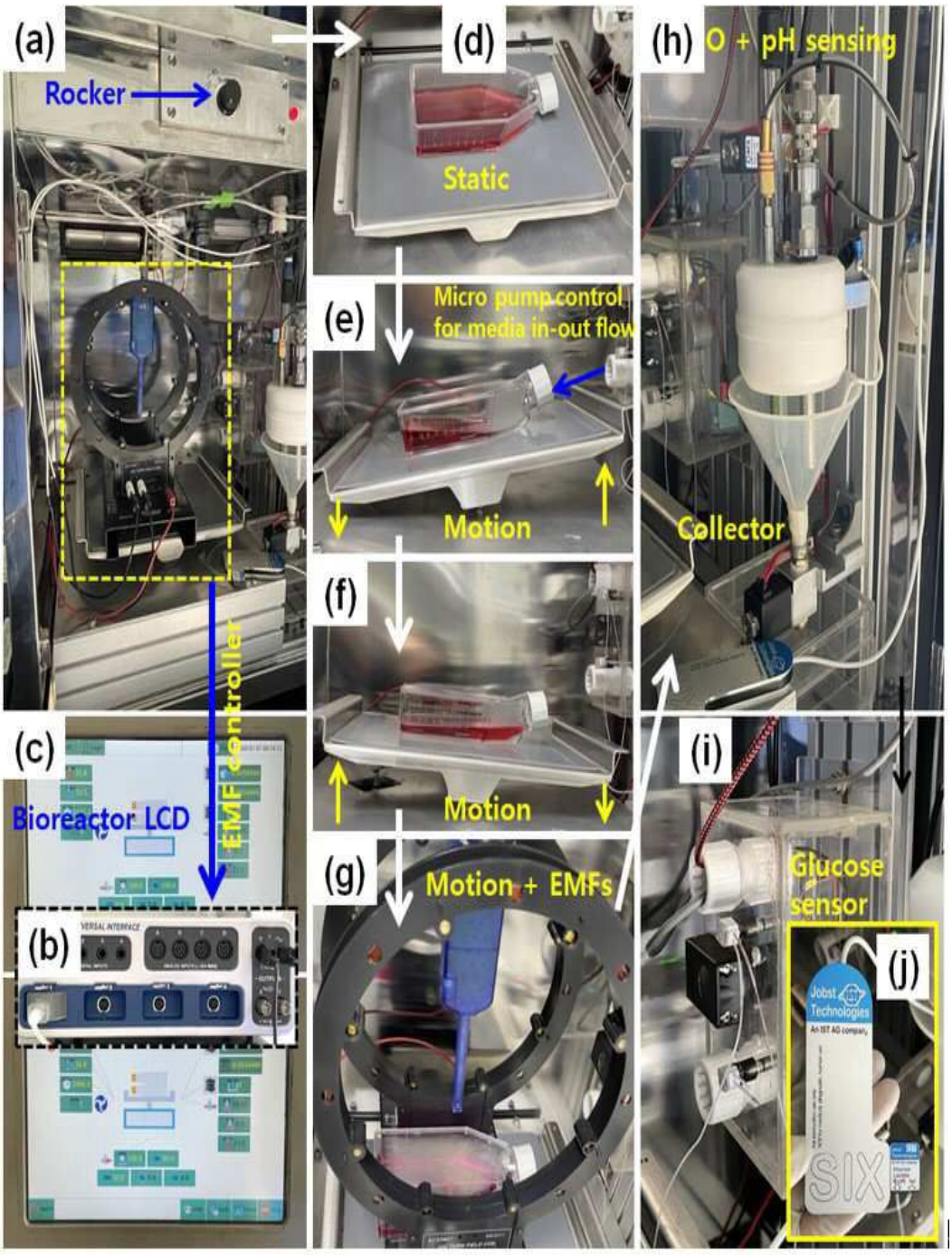


도면1e

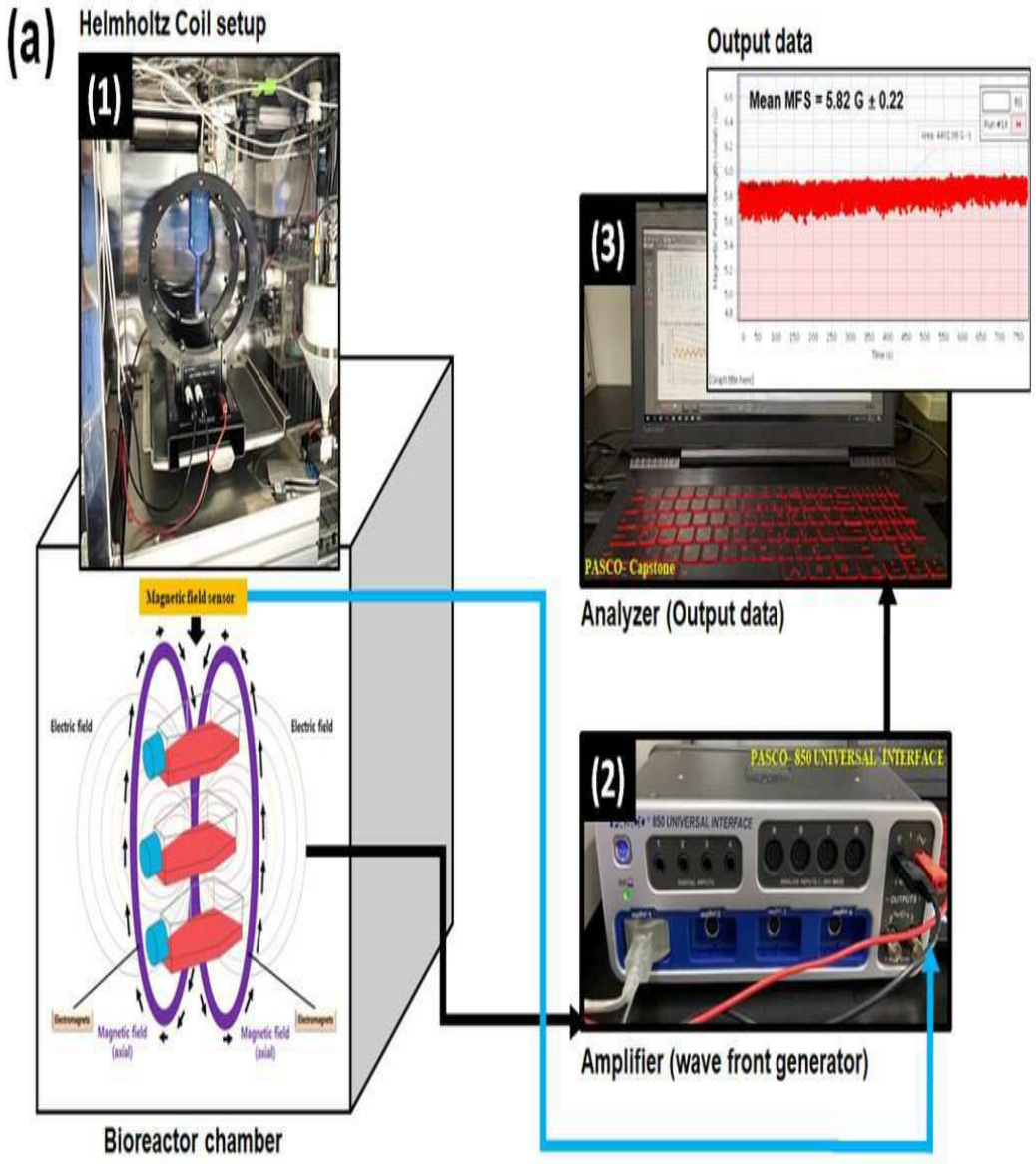

Front side
Back side
16
17
AIR
CO2
OUT
AC팬
가스입력 및 출력 포트
AC 220V 20A
각종 센서들 케이블 연결 포트들

도면1f

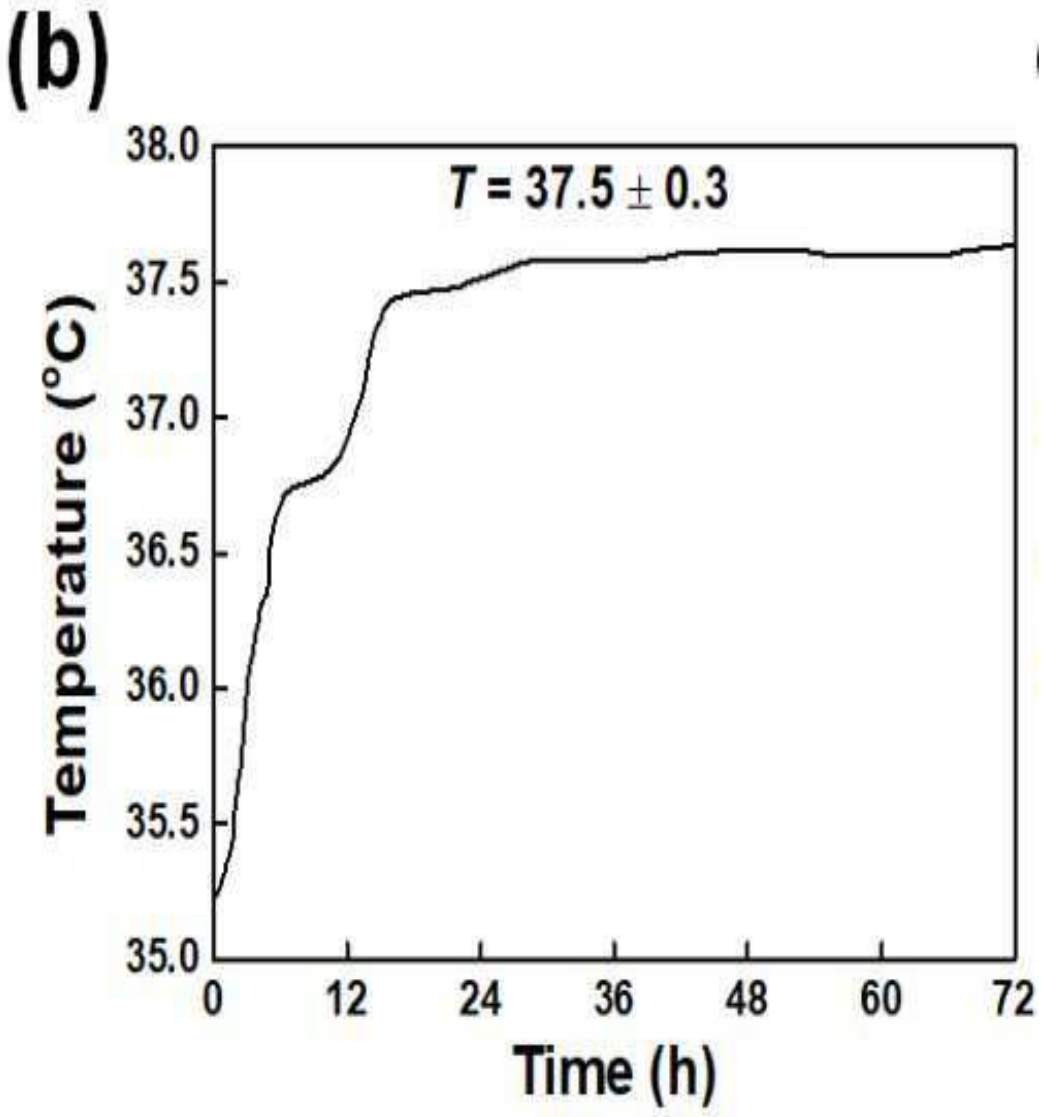
도면2


(a)
Rocker
(b)
(c)
Bioreactor LCD
EMF controller
(d)
Static
(e)
Micro pump control
for media in-out flow
Motion
(f)
Motion
(g)
Motion + EMFs
(h)
O + pH sensing
Collector
(i)
Glucose
sensor
(j)
Jobst
Technologies
SIX

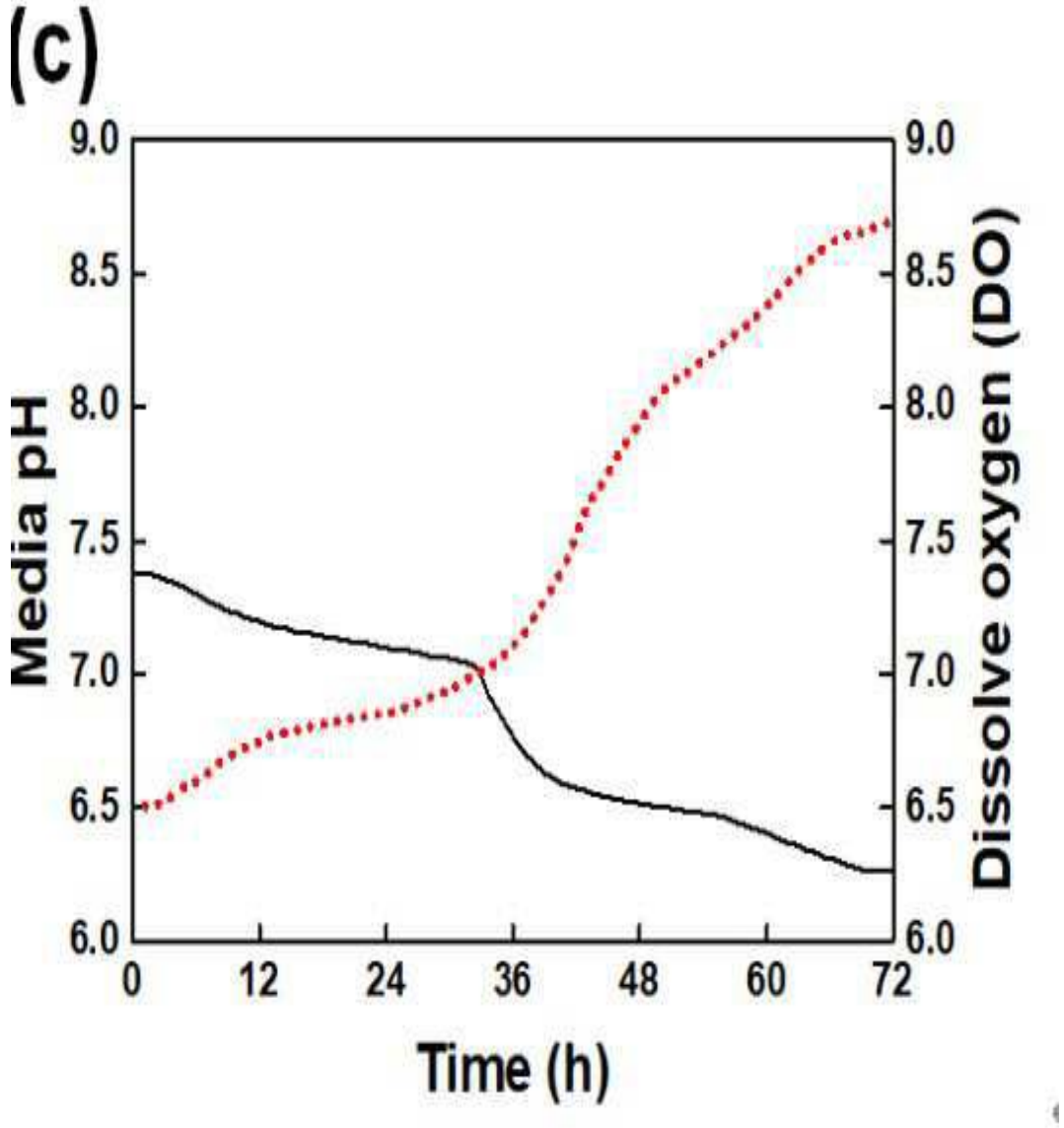
도면3a


(a)
Helmholtz Coil setup
(1)
Output data
Mean MFS = 5.82 G ± 0.22
(3)
PASCO- Capstone
Analyzer (Output data)
Magnetic field sensor
Electric field
Electric field
Magnetic field (axial)
Magnetic field (axial)
(2)
PASCO- 850 UNIVERSAL INTERFACE
Amplifier (wave front generator)
Bioreactor chamber

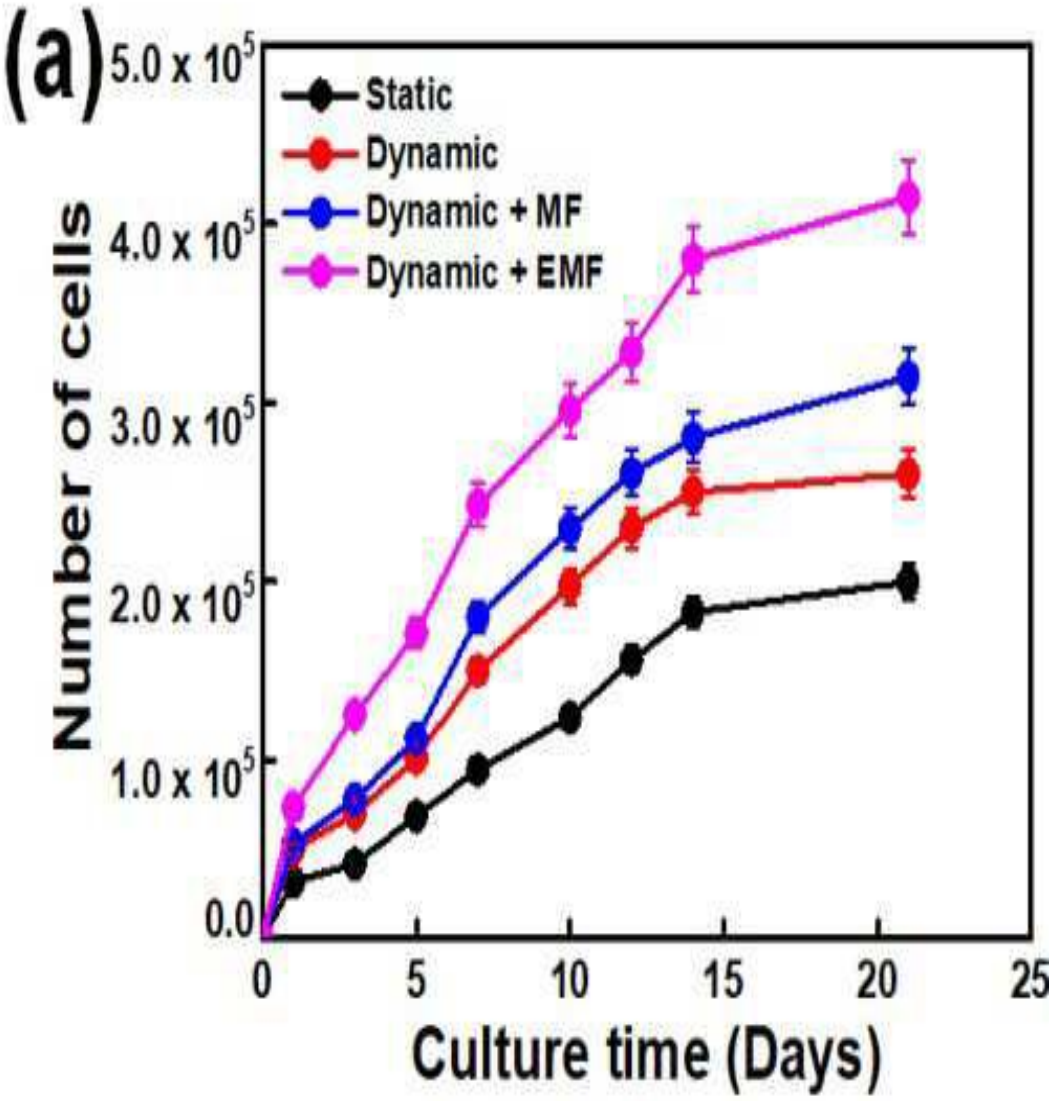
도면3b


(b)
T = 37.5 ± 0.3
Temperature (°C)
38.0
37.5
37.0
36.5
36.0
35.5
35.0
0
12
24
36
48
60
72
Time (h)

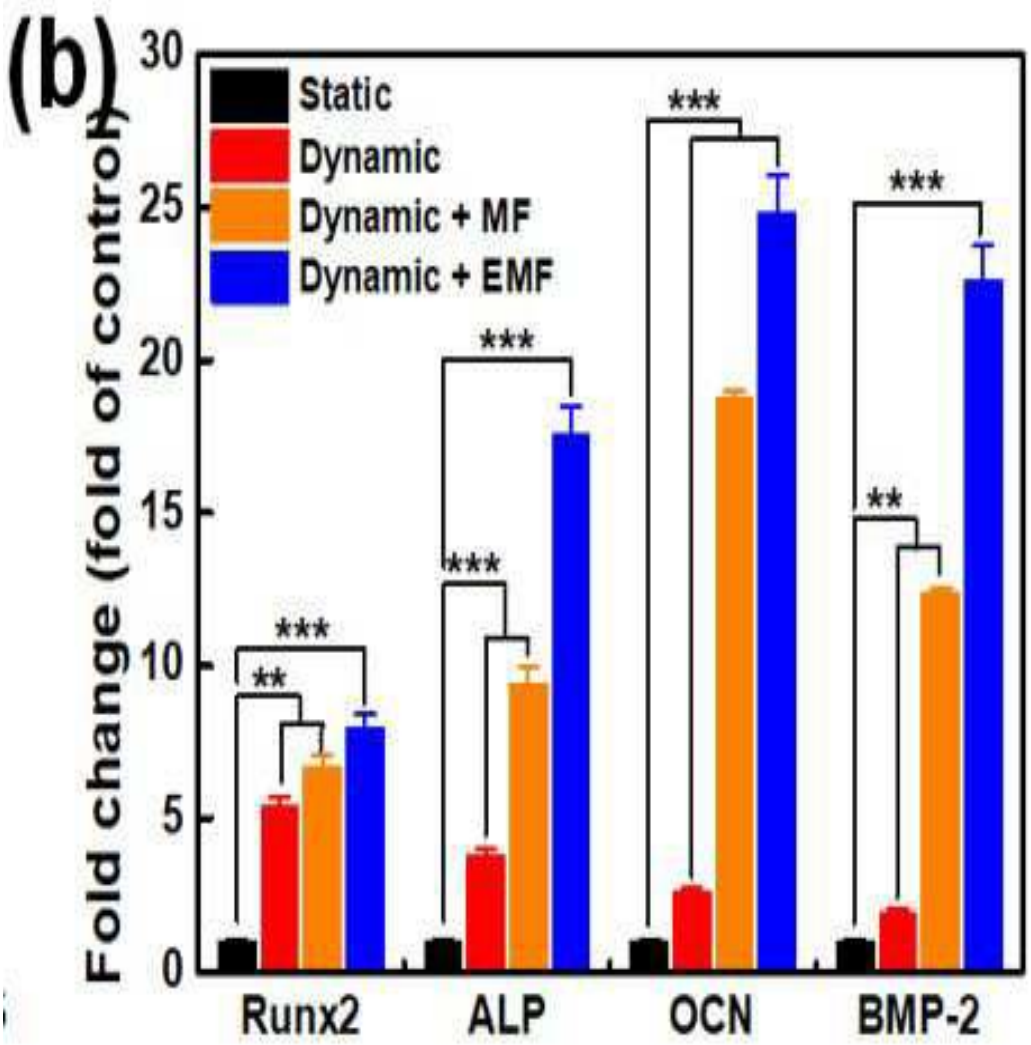
도면3c


(c)
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
Media pH
Dissolve oxygen (DO)
0
12
24
36
48
60
72
Time (h)

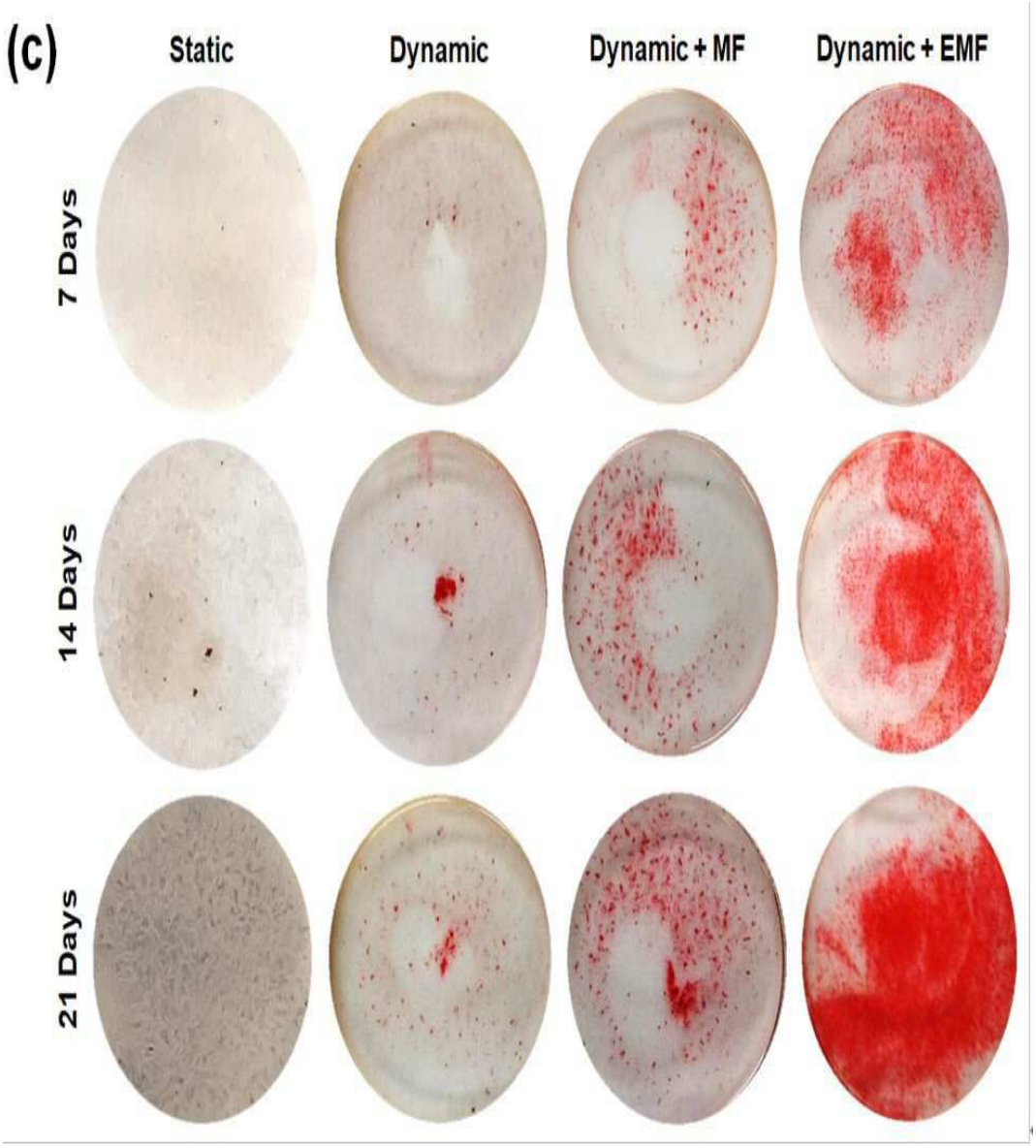
도면4a


(a)
5.0 x 10^5
4.0 x 10^5
3.0 x 10^5
2.0 x 10^5
1.0 x 10^5
0.0
Number of cells
Static
Dynamic
Dynamic + MF
Dynamic + EMF
0
5
10
15
20
25
Culture time (Days)

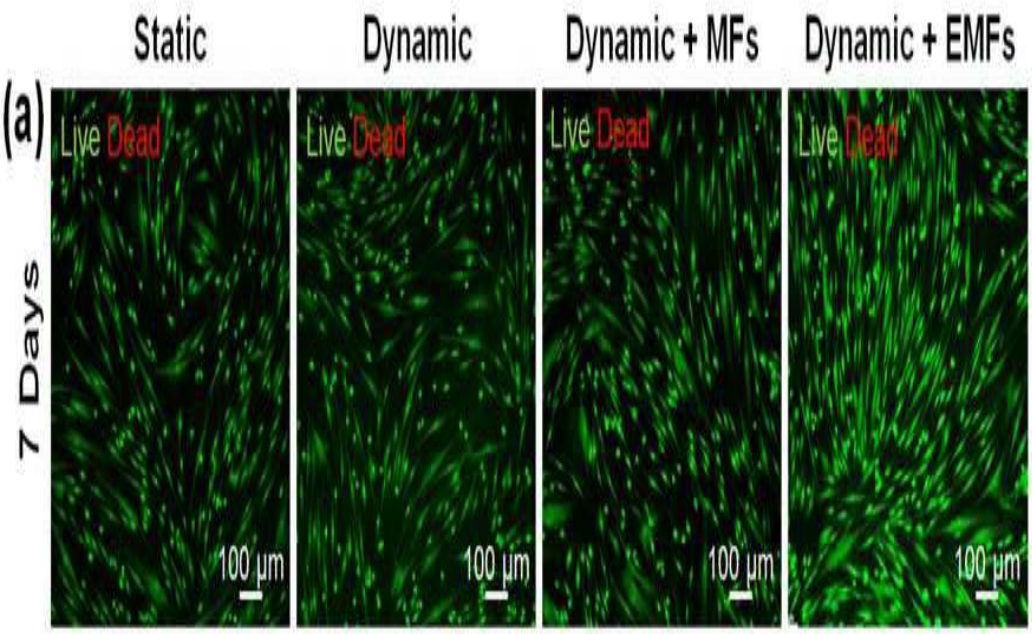
도면4b


(b)
Fold change (fold of control)
30
25
20
15
10
5
0
Static
Dynamic
Dynamic + MF
Dynamic + EMF
***
**
***
***
***
**
Runx2
ALP
OCN
BMP-2

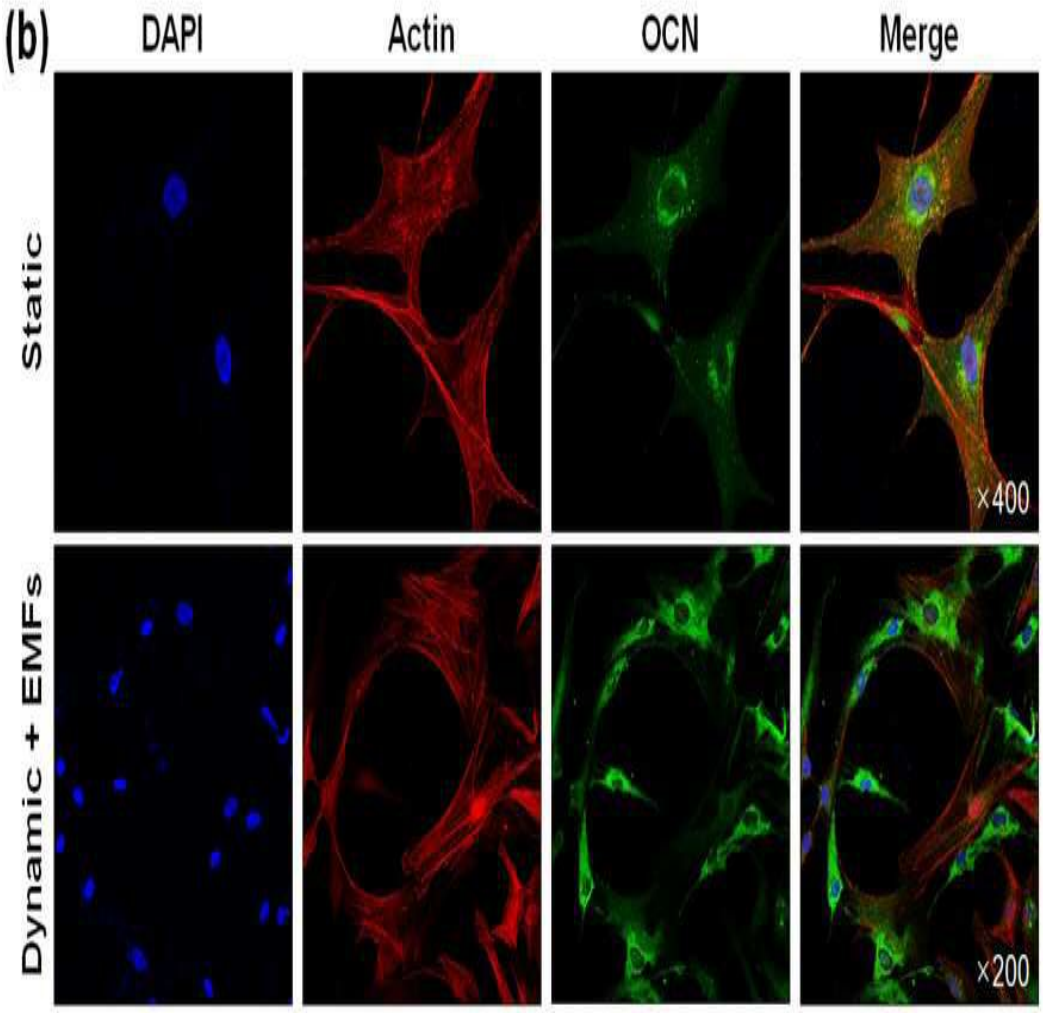
도면4c


(c)
Static
Dynamic
Dynamic + MF
Dynamic + EMF
7 Days
14 Days
21 Days

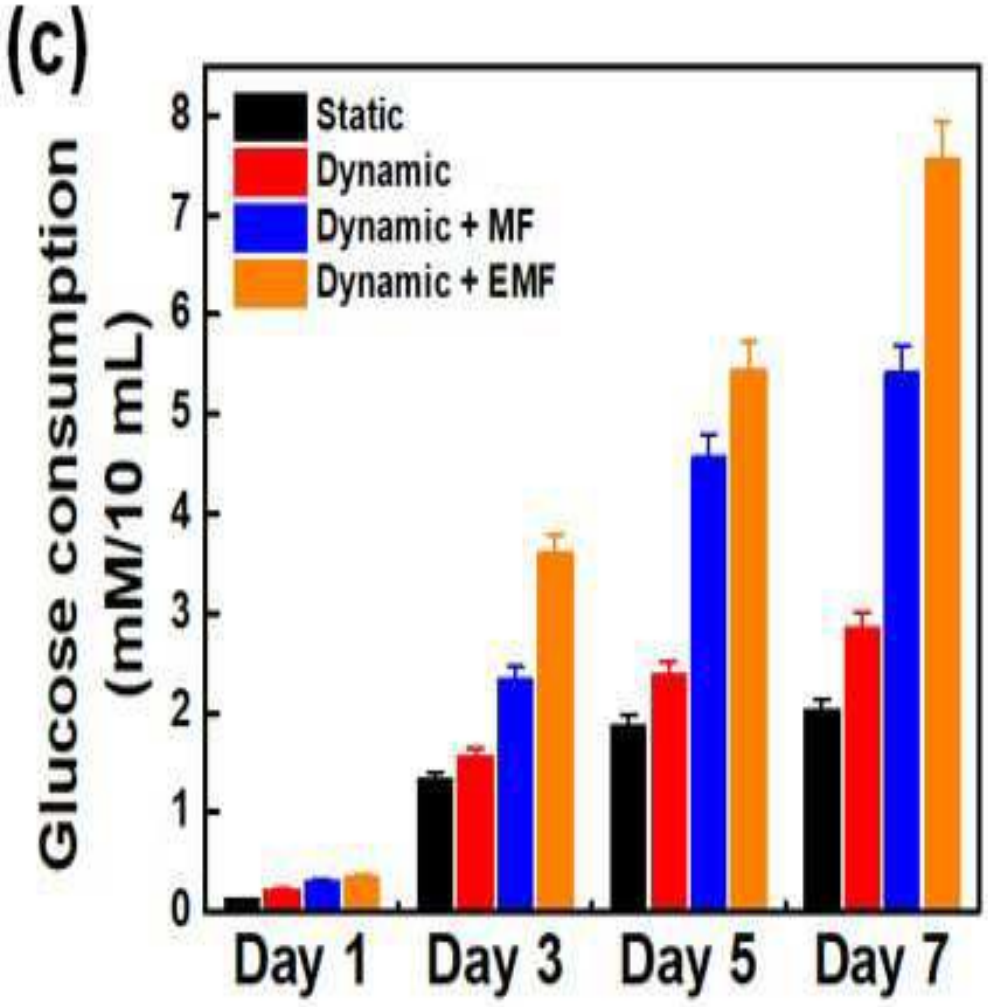
도면5a


Static
Dynamic
Dynamic + MFs
Dynamic + EMFs
(a)
7 Days
Live Dead
100 μm

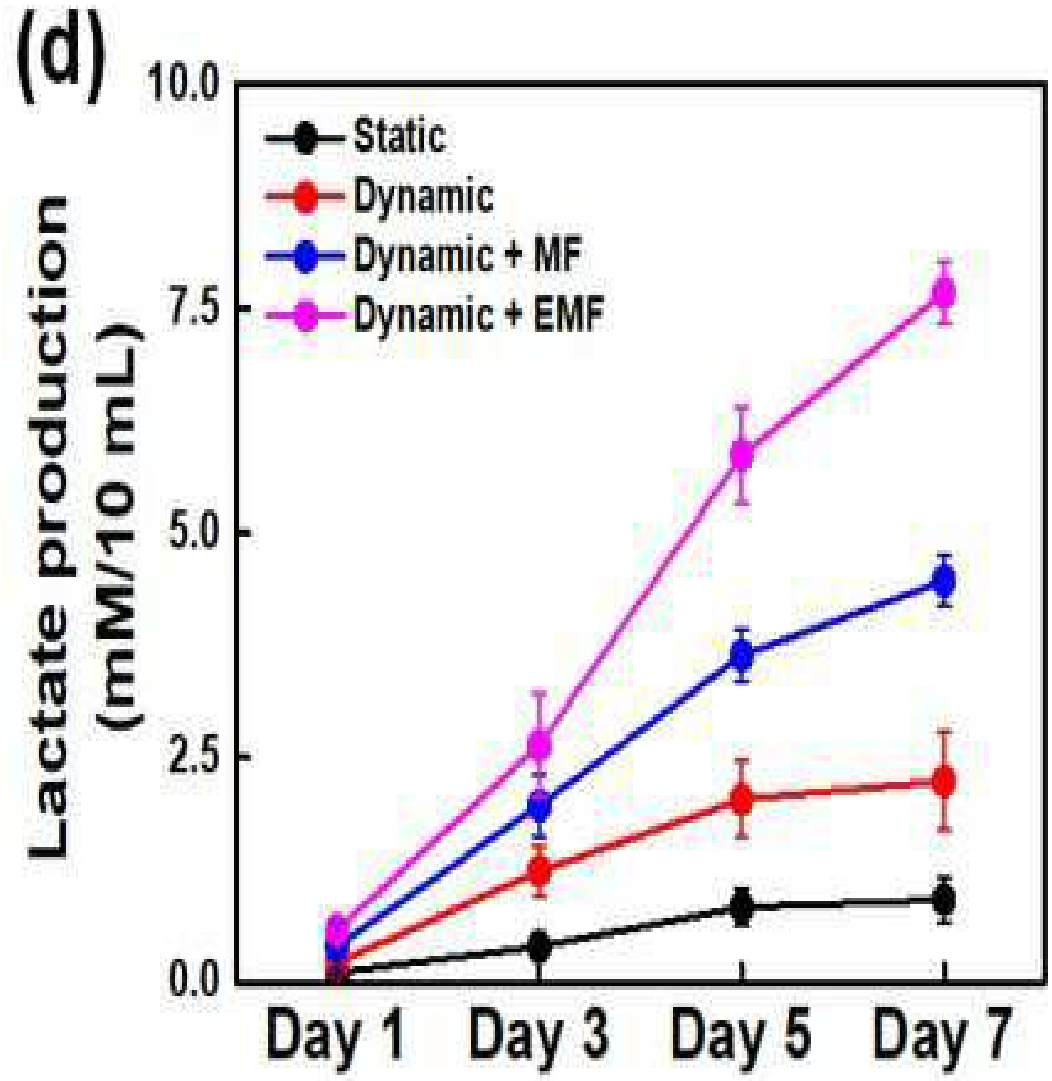
도면5b



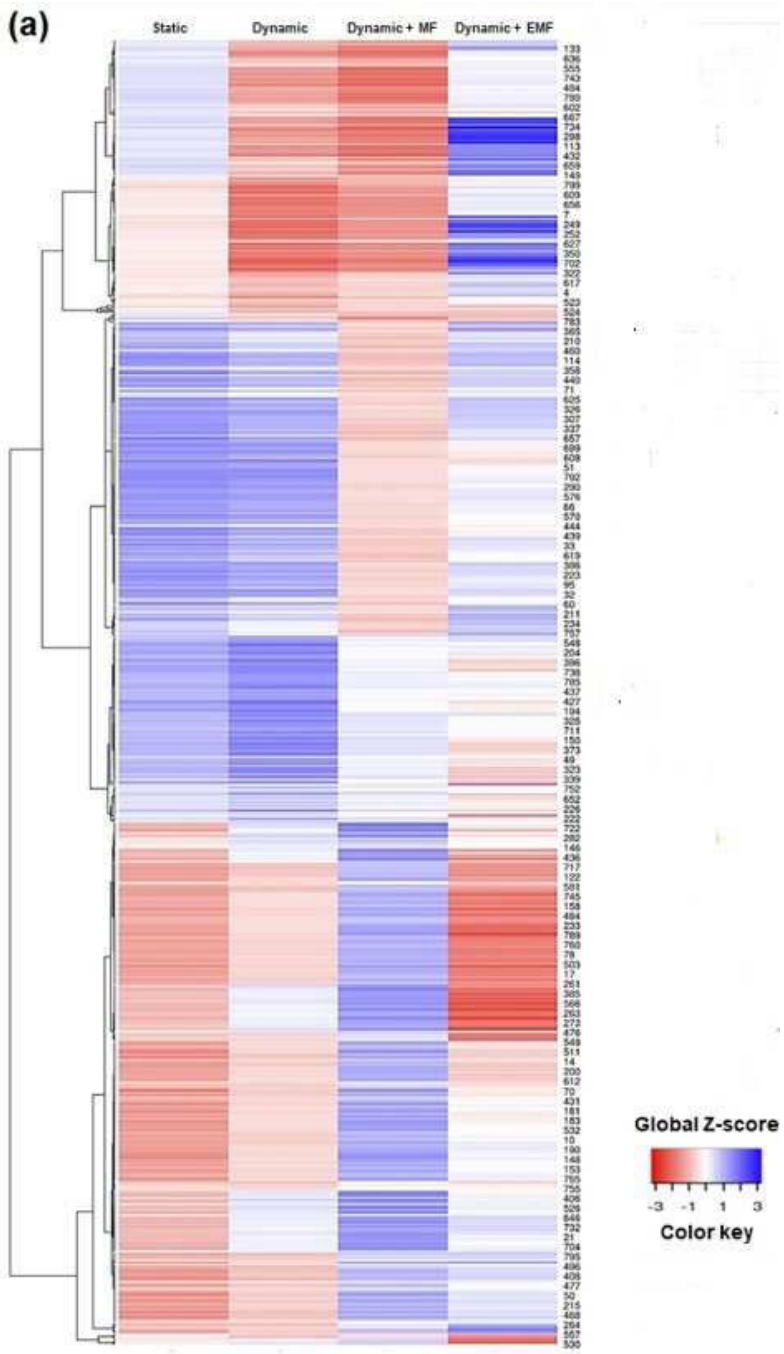
도면5c


(c)
Glucose consumption (mM/10 mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Static
Dynamic
Dynamic + MF
Dynamic + EMF
Day 1
Day 3
Day 5
Day 7

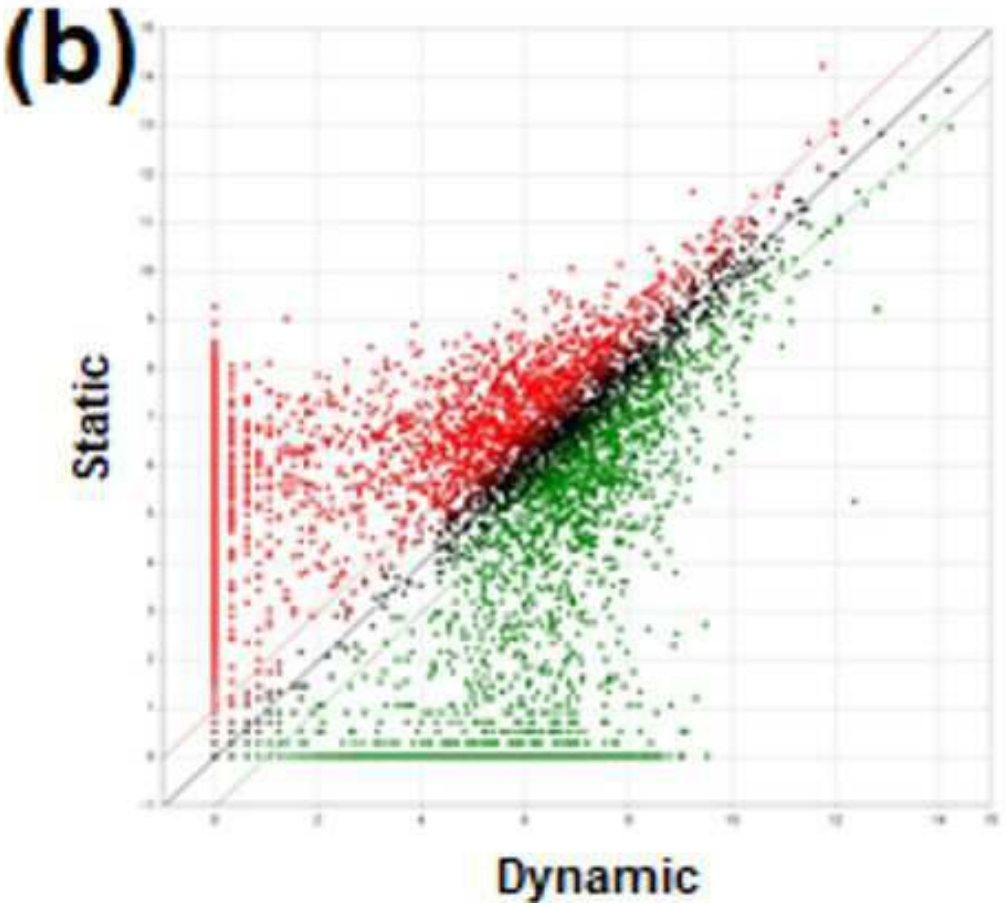
도면5d


(d)
Lactate production (mM/10 mL)
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
Static
Dynamic
Dynamic + MF
Dynamic + EMF
Day 1
Day 3
Day 5
Day 7

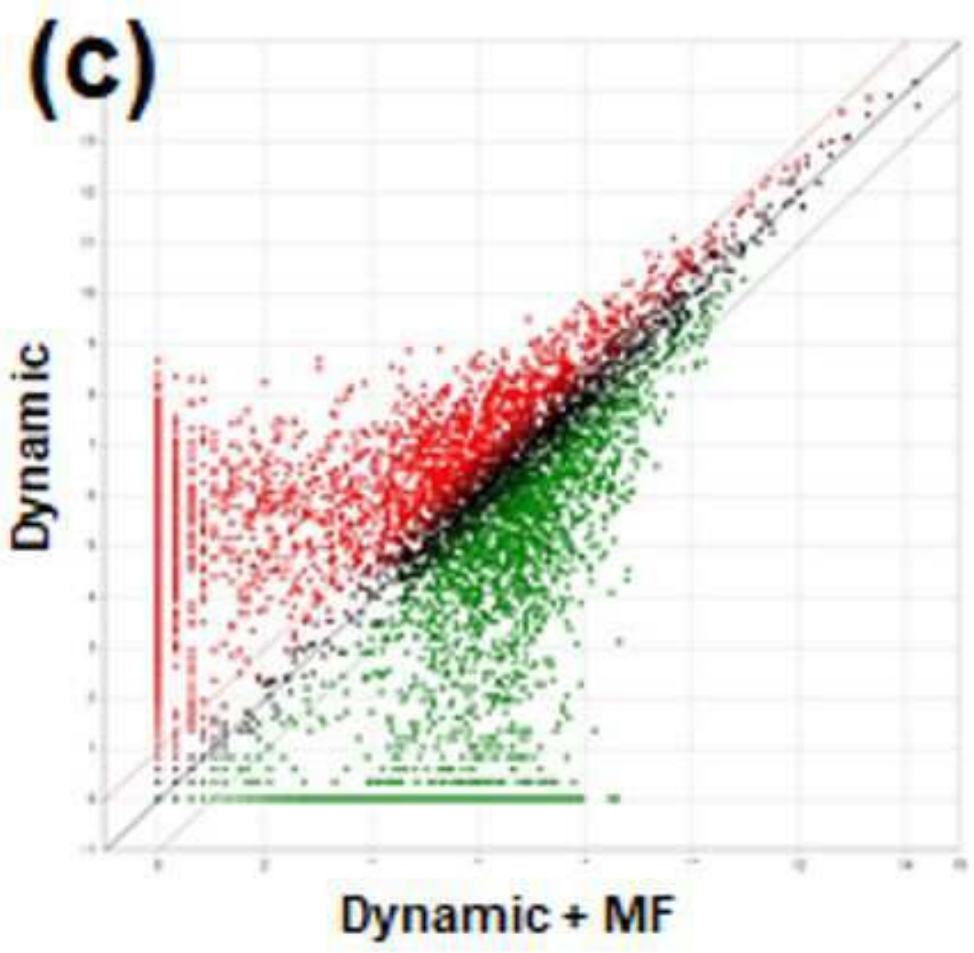
도면6a


(a)
Static
Dynamic
Dynamic + MF
Dynamic + EMF
Global Z-score
-3
-1
1
3
Color key

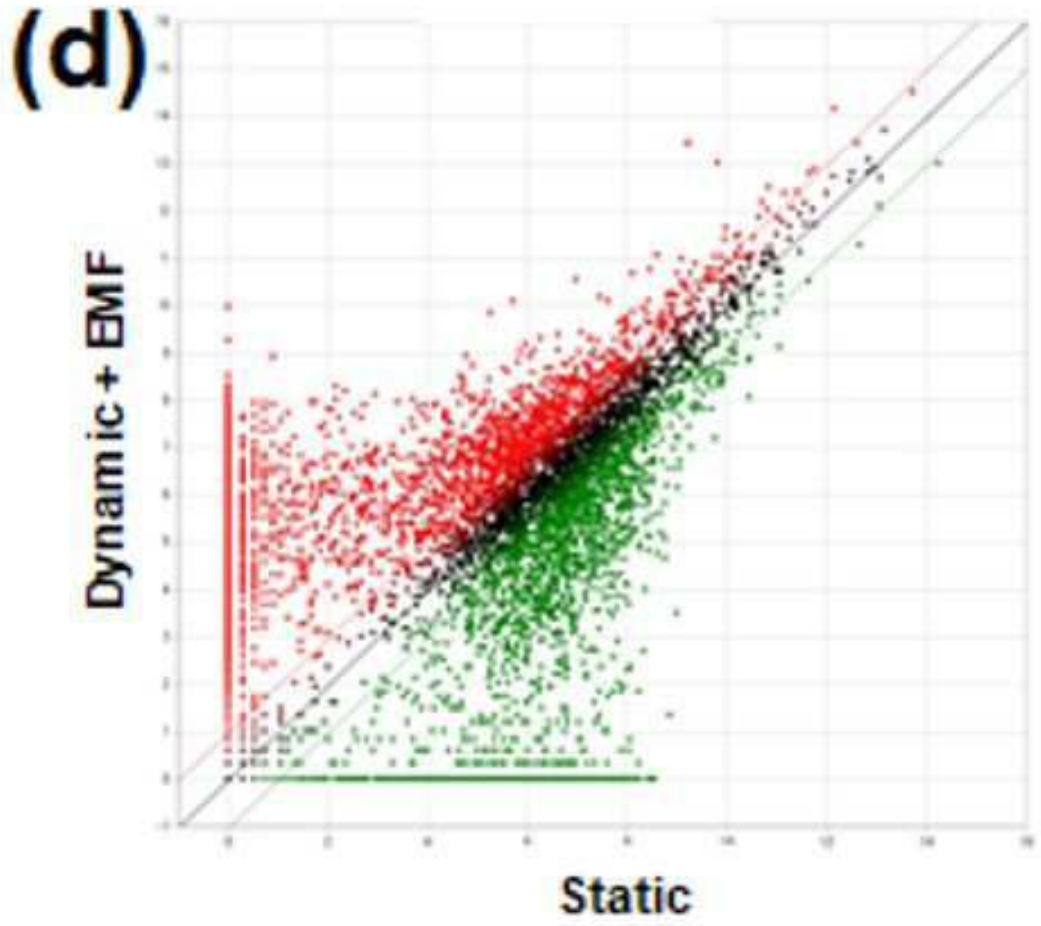
도면6b



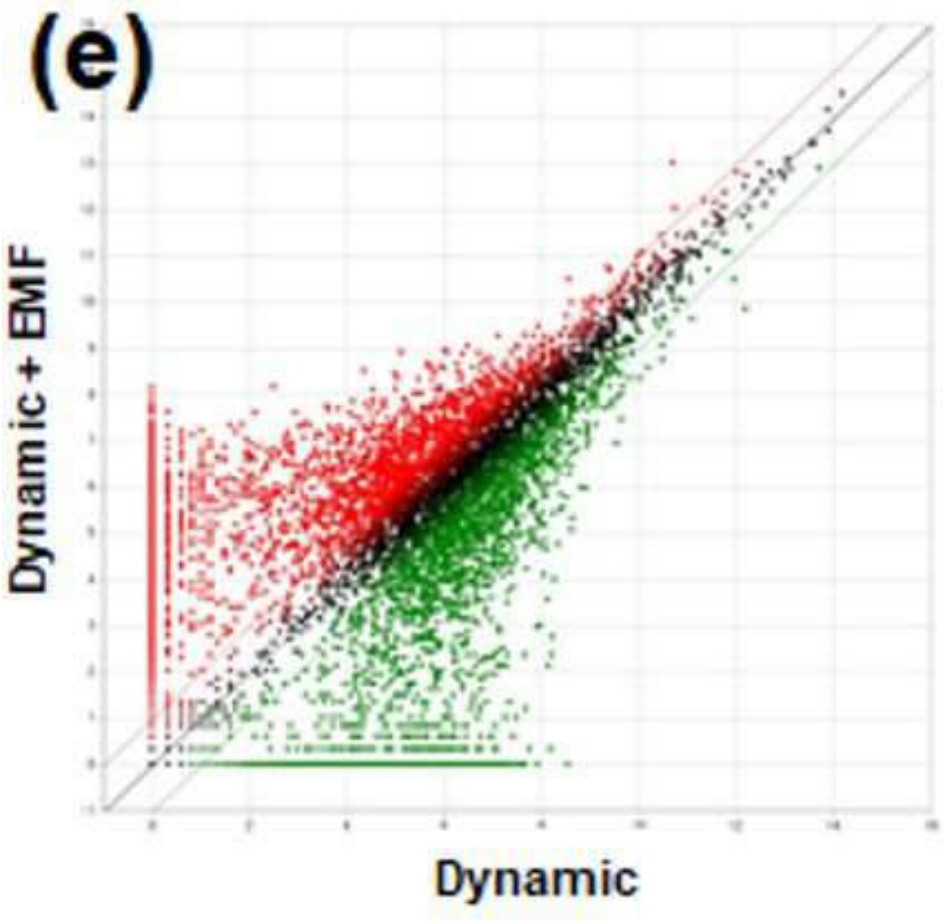
도면6c



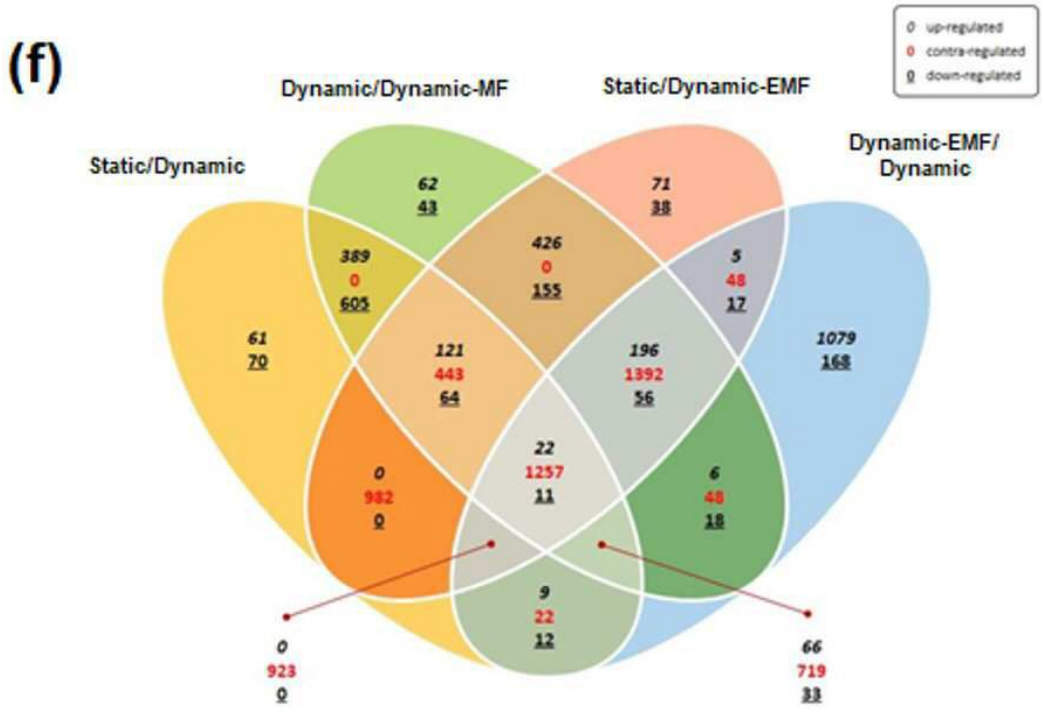
도면6d



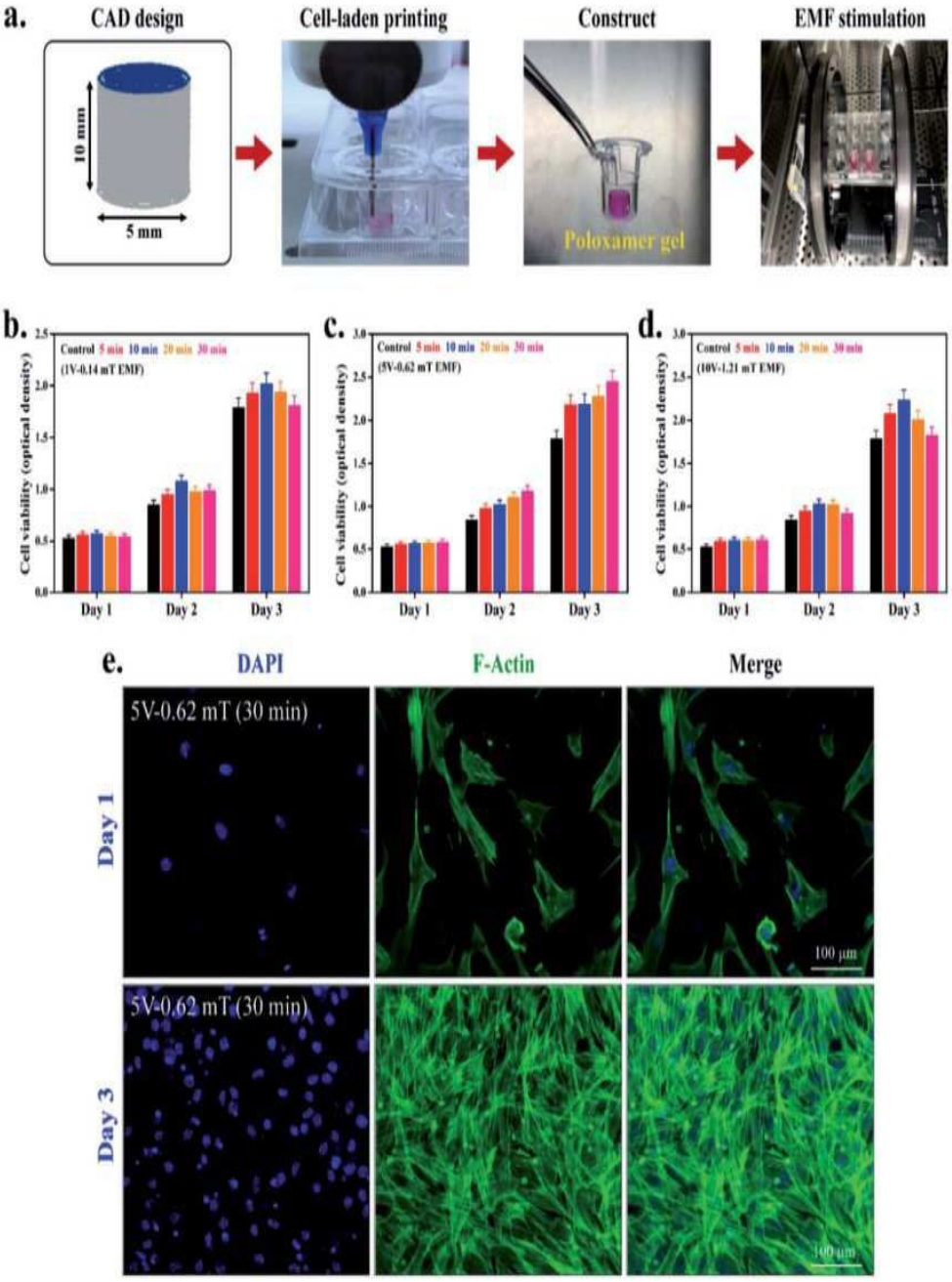
도면6e


(e)
Dynamic + EMF
Dynamic

도면6f


(f)
0 up-regulated
0 contra-regulated
0 down-regulated
Dynamic/Dynamic-MF
Static/Dynamic-EMF
Static/Dynamic
Dynamic-EMF/ Dynamic
62
43
71
38
389
0
605
426
0
155
5
48
17
61
70
121
443
64
196
1392
56
1079
168
22
1257
11
0
982
0
6
48
18
9
22
12
0
923
0
66
719
33

도면7


a.
CAD design
Cell-laden printing
Construct
EMF stimulation
10 mm
5 mm
Poloxamer gel
b.
c.
d.
Control 5 min 10 min 20 min 30 min
(1V-0.14 mT EMF)
(5V-0.62 mT EMF)
(10V-1.21 mT EMF)
Cell viability (optical density)
Day 1
Day 2
Day 3
e.
DAPI
F-Actin
Merge
5V-0.62 mT (30 min)
Day 1
Day 3
100 μm