

줄기세포 배양 및 심근세포 분화를 위한 배양 플랫폼 (기술분류-첨단바이오-유전자·세포 치료)

기술성 분석

기술 개요

- 본 기술은 PVDF(폴리비닐리덴 플루오라이드) 나노섬유에 효율적으로 고정하고 리간드를 정교한 오리엔테이션으로 세포에 제시하기 위해 비트로넥틴 펩티드를 혼합 접착 단백질(MAP)과 융합한 지지체에 관한 것임
- 비트로넥틴 펩티드-MAP 융합 단백질(VNm)로 코팅된 PVDF 지지체에서 배양할 때, hPSC는 다능성 마커의 발현과 계층 무결성을 유지하면서 10개 이상의 계대 동안 안정적으로 증식하였으며, 심장 분화를 위한 배양 조건에서 VNm이 있는 PVDF 지지체의 hPSC는 매트리지엘(Matrigel)에 비해 자발적으로 박동하는 콜로니와 상향 조절된 심장 관련 유전자를 더 많이 생성함

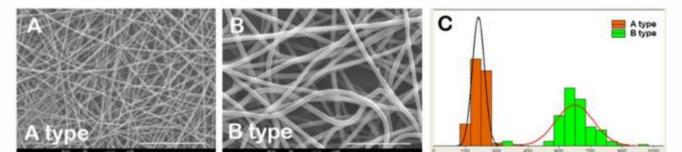
미해결 과제(Unmet needs)

- 전기방사 PVDF 나노막의 세포 접착성 개선의 어려움
 - 인간 배아 줄기 세포(hESC) 및 유도 만능 줄기 세포(hiPSC)를 포함하는 인간 다능성 줄기 세포(hPSC)는 무한한 증식 능력과 광범위한 분화 잠재력으로 인해 생물 의학 응용 및 재생 의학에 귀중한 공급원을 제공함
 - PVDF는 정교한 마이크로패턴 또는 나노섬유를 생성하기 위해 쉽게 가공할 수 있는 잘 알려진 물질로, 독특한 기계적 강도와 압전 특성으로 인해 줄기 세포 배양에도 적용됨
 - 최근 연구에 따르면 hPSC는 PVDF 기반 나노 지지체에서 조골세포 유사 세포로 성장하고 분화할 수 있으나, hPSC의 부착을 지원하는 PVDF 기반 지지체의 능력은 소수성 특성으로 인해 제한됨
 - 따라서 적절한 직경 및 기공 크기 등 PVDF 지지체의 물리적 특성을 최적화하고 세포 부착 및 성장을 개선하기 위해 접합될 적절한 ECM(세포외기질) 구성 요소를 찾기 위해 집중적인 노력이 필요함

기술적 해결수단(발명의 구성)

- 1) VNm을 제조하는 방법
 - fp-1로 구성된 재조합 비트로넥틴 펩티드-MAP 융합 단백질(VNm)을 제조하였으며, 융합 단백질은 fb-5의 각 말단에 fb-1의 데카펩티드 반복이 있는 MAP(해당 DNA 구성은 fb-151로 지칭됨) 및 MAP의 C-말단에 결합되고 hPSC-지지 활성이 이전에 입증된 비트로넥틴에서 유래된 헤파린 결합 펩티드를 포함하도록 설계함
- 2) PVDF 지지체에 VNm을 고정하는 방법
 - VNm을 코팅하기 전에 20mM 아세트산 나트륨 완충액(pH 6.5)에 용해된 10mM(6.7 mg/mL) EDC 및 10 mM(8.7 mg/mL) NHS가 포함된 용액으로 실온에서 30분 동안 전처리하여 PVDF 막을 활성화한 후, VNm(0.05 µg/mL)을 첨가하고 실온에서 30분 동안 반응시켜 증류수로 3회 세척한 후 막을 실온에서 완전히 건조시킴

본 발명의 PVDF 지지체의 특성



(A), (B): PVDF 막에 있는 섬유의 대표적 SEM 이미지 (축적 막대: 10 µm, A type: 200nm 직경, B type: 700nm 직경)

(C): PVDF 섬유 직경의 분포

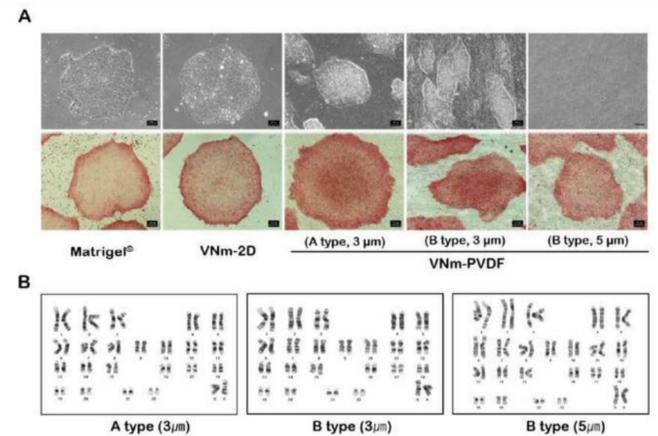
이와 유사한 형태학적 특징이 VNm 고정 후에도 관찰됨에 따라 VNm 코팅을 사용한 표면 변형이 PVDF 나노막의 무결성을 변경하지 않음을 확인함

본 기술의 우수성 및 파급 효과

본 기술의 우수성(효과)

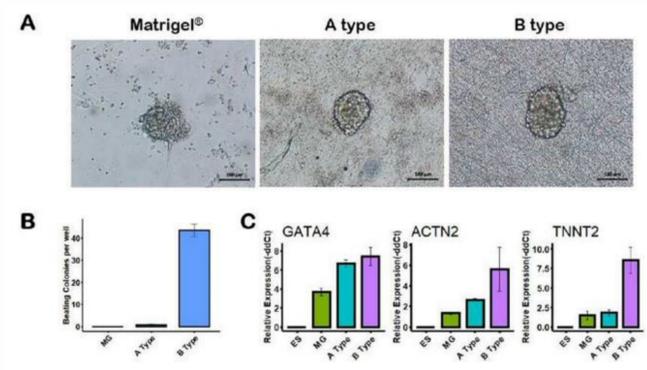
- PVDF 지지체에서 hPSC의 장기 유지
 - 장기 배양에서 미분화 상태를 안정적으로 유지하는 것은 새로운 배양 플랫폼에서 해결해야 하는 가장 중요한 속성 중 하나로, hPSC의 장기 유지를 지원하는 VNm 코팅 PVDF 지지체의 능력을 조사함
 - (A) 콜로니는 섬유의 직경과 지지체의 두께가 증가함에 따라 두꺼워지고 작아지는 경향이 있었지만 AP 염색은 테스트된 모든 VNm 코팅 PVDF 지지체에서 강한 반응성을 보여줌
 - (B) 핵형 분석을 통해 막 두께와 섬유 직경에 관계없이 10계대에 걸쳐 염색체 이상이 없음을 보여줌
 - 따라서, VNm으로 코팅된 PVDF 지지체가 hPSC의 부착과 다회 계대 이상 안정적인 유지를 효율적으로 지원할 수 있음을 확인함
- PVDF 지지체에서 hPSC의 심근 분화
 - VNm으로 코팅된 섬유 직경 (A type 및 B type)이 다른 두 개의 PVDF 지지체를 사용하여 hPSC를 시드하고 심장 분화 조건 하에서 분화하도록 유도함
 - (A) 여러 개의 소형 콜로니가 배양 웰에 나타났으며, 그 중 일부는 자발적으로 박동함
 - (B) 2주 동안의 분화에서 A type보다 B type 지지체에서 자발적으로 박동하는 콜로니를 더 관찰했지만, Matrigel에서는 박동하는 콜로니가 거의 관찰되지 않음
 - (C) 정량적 유전자 발현 분석을 통해 ACTN2, GATA4 및 TNNT2를 포함한 심장 특이적 마커 유전자가 대조군에 비해 유의하게 상향 조절됨

두께와 섬유 직경이 다른 PVDF 지지체에서 hESC의 성장



A type: 200nm 직경, B type: 700nm 직경

VNm으로 코팅된 PVDF 지지체에서 hESC의 심장 분화



적용 제품 및 파급 효과

- 심장 분화 플랫폼
- hPSC의 장기 배양과 심장 세포로의 분화에 있어, VNm으로 코팅된 PVDF 지지체의 유용성을 확인함으로써 재생 의학에서 그 응용을 확대할 수 있으며, 새로운 심장 분화 플랫폼을 제공할 수 있음

지식재산권 현황

발명의 명칭	출원/등록번호	출원/등록일자
줄기세포 배양 및 심근세포 분화를 위한 배양 플랫폼	10-2020-0007951	2020.01.21.
패밀리 특허 현황	패밀리 국가	

문의 | 고려대학교 산학협력단 기술사업화센터 권성진 02-3290-5832, giannie77@korea.ac.kr