



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0094327
(43) 공개일자 2021년07월29일

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

(52) CPC특허분류
C12N 5/0657 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0007951

(22) 출원일자 2020년01월21일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자
김대성

서울특별시 성동구 금호로 173, 104동 606호 (금호동2가, 신금호파크자이)

연구범

경기도 성남시 분당구 미금로 177, 308동 702호 (구미동, 까치마을신원아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

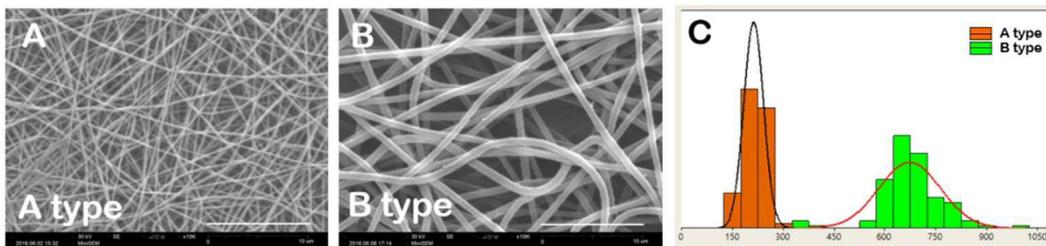
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포 배양 및 심근세포 분화를 위한 배양 플랫폼

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 배양 및 심근세포 분화를 위한 배양 플랫폼에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2506/45 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017M3A9F8032402
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(원천)바이오의료기술개발사업
연구과제명	생리활성물질 및 세포외기질 고정화를 통한 전분화능 줄기세포의 고효율 유지 배양
및 분화용 배양기 개발	
기여율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2020.03.31

청구범위유예 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체; 및
- (ii) 상기 나노섬유에 결합된 홍합 접착 단백질과 비트로넥틴 유래 펩타이드의 융합 펩타이드;를 포함하는, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유는 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리톨산(PGA), 폴리[(락틱-co-글리콜산)](PLGA), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)](PHBV) 및 폴리비닐알코올(PVA)로 이루어진 군에서 선택되는 물질로 이루어진, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유는 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF)로 이루어진, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유는 직경이 100 내지 1000 nm인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체는 두께가 1 내지 10 μm 인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생체적합성 나노섬유로 이루어진 지지체는 기공 크기가 0.2 내지 2.0 μm 인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 전분화능 줄기세포인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 역분화 줄기세포인, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 줄기세포 배양용 지지체는 줄기세포의 제노프리(xenofree) 배양에 사용되는, 줄기세포 배양용 지지체.

청구항 10

제1항의 줄기세포 배양용 지지체에서 줄기세포를 배양하는 단계;를 포함하는, 줄기세포의 장기 유지 배양 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 줄기세포의 장기 유지 배양 방법은 줄기세포를 10계대 이상 배양하는 것인, 줄기세포의 장기 유지 배양 방법.

청구항 12

- (a) 제1항의 줄기세포 배양용 지지체에서 줄기세포를 배양하는 단계; 및
- (b) 배양된 줄기세포를 줄기세포 배양용 지지체 상에서 심근세포로 분화를 유도하는 단계;를 포함하는, 줄기세포로부터 심근세포를 분화시키는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 (b)는 줄기세포를 심근세포 분화 유도 배지에서 배양하는 것인, 줄기세포로부터 심근세포를 분화시키는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 줄기세포 배양용 지지체는 직경이 500 내지 900 nm인 나노섬유로 이루어진, 줄기세포로부터 심근세포를 분화시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 비트로넥틴 유래 펩타이드가 고정된 폴리비닐리덴 플루오라이드 기반 나노막에서 인간 다능성 줄기 세포의 안정적인 유지 및 심장 분화

배경 기술

[0003] 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도 만능 줄기 세포 (hiPSC)를 포함하는 인간 다능성 줄기 세포 (hPSC)는 무한 증식 능력과 광범위한 분화 잠재력으로 인해 생물 의학 응용 및 재생 의학에 귀중한 공급원을 제공한다. hPSC의 성공적인 적용을 위한 전제 조건 중 하나는 이러한 세포를 대량으로 정의된 "이종이없는(xenofree)" 조건에서 증식할 수 있는 능력이다. 현재까지 여러 합성 또는 천연 고분자, 세포외 기질 (ECM)에서 분리된 성분 및 이러한 ECM 성분에서 유래된 조각된 펩타이드가 hPSC에 대한 적절한 기질로 정의된 배양 조건을 준비하는 데 사용되었으며, 그중 일부는 이미 상용화되었고 실험실과 산업 모두에서 널리 사용된다 (Celiz et al., 2014).

[0004] 일반적으로 ECM 재료는 배양 플레이트의 플라스틱 바닥에 흡수되어 줄기 세포가 성장할 수 있는 2차원 환경을 제공하는 동시에 부착 및 증식을 위해 세포에 중요한 기능적 모티프를 제시한다. 최근 연구는 또한 실제 줄기 세포 "주변환경(niche)"를 모방하고 세포의 부착, 생존 및 분화를 촉진하는 ECM 구성 요소와 결합된 다양한 유형의 하이드로겔로 구성된 향상된 3차원 배양 플랫폼을 제공하기 위해 상당한 진전을 이루었다 (Madl & Heilshorn, 2018). 또한, 완전히 3차원 플랫폼은 아니지만 패턴 토폴로지를 가진 마이크로 내지 나노 크기의 직조 지지체는 hPSC의 유지 배양에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Lim & Mao, 2009). 이러한 결과는 hESC가 파생된 배반포의 미세 환경이 완전히 이해되지 않았음에도 불구하고 hPSC가 주변의 특정 물리적 단서에 반응하고 이에 적응할 수 있는 능력이 있음을 의미한다.

[0005] 전기방사 기술로 생산된 직조 섬유성 물질은 세포의 기저막과 유사한 물리적 환경을 제공할 수 있다 (Krishna et al., 2016). 나노 규모 섬유막을 생산하기 위해 다양한 종류의 생체 재료가 전기 방사되었으며, hPSC를 포함한 다양한 줄기 세포에 부착 및 성장 능력이 테스트되었다. 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF)는 정교한 마이크로패턴 또는 나노섬유를 생성하기 위해 쉽게 가공할 수 있는 잘 알려진 물질로, 이후 세포 배양 연구 및 조직 공학에 사용할 수 있다 (Ardeshiryajimi, Ghaderian, Omrani, & Moradi, 2018). Mirzaei et al., (2019). PVDF의 장기적인 안정성과 생체 적합성은 임상에서 오랫동안 사용된 단일필라멘트 혈관 봉합사로 예시된 것처럼 수십 년 동안 입증되었다 (Laroche et al., 1995). 독특한 기계적 강도와 압전 특성으로 인해 줄기 세포 배양에도 적용되었다. 최근 연구에 따르면 hPSC는 PVDF 기반 나노 지지체에서 조골세포 유사 세포로 성장하고 분화할 수 있다 (Laroche et al., 1995). 그러나 hPSC의 부착을 지원하는 PVDF 기반 지지체의 능력은 소수성 특성으로 인해 제한된다. 따라서 적절한 직경 및 기공 크기와 같은 PVDF 지지체의 물리적 특성을 최적화하고 세포 부착 및 성장을 개선하기 위해 접합될 적절한 ECM 구성 요소를 찾기 위해 집중적인 노력이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 연구는 hPSC 배양에 대한 PVDF 나노막 지지체의 잠재력을 조사했다. 우리는 hPSC의 부착 및 성장을 지원하는 능력이 이미 확인된 비트로넥틴 펩타이드를 고정하여 전기방사 PVDF 나노막의 세포 접착성을 향상시켰다 (Klim, Li, Wrighton, Piekarczyk, & Kiessling, 2010). 이를 위해 PVDF 나노 섬유에 효율적으로 고정하고 리간드를 정의된 방향으로 세포에 제시하기 위해 비트로넥틴 펩타이드를 혼합 접착 단백질 (MAP)과 융합시켰다. 이 연구에서 우리는 기존의 매트릭스-코팅 배양 접시에 비해 그러한 지지체에서 hPSC의 부착, 성장 및 심장 분화를 조사하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 이를 위해 PVDF 나노섬유에 효율적으로 고정하고 리간드를 정교한 오리엔테이션으로 세포에 제시하기 위해 비트로넥틴 펩타이드를 혼합 접착 단백질(MAP)과 융합하였다. 본 연구에서 우리는 기존의 매트릭스 코팅 배양 접시에 비해 상기 지지체에서의 hPSC의 부착, 성장 및 심장 분화를 조사하였다.

발명의 효과

[0011] 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF)는 생체 적합성, 제조 용이성 및 압전 특성을 가진 재료이며 많은 생물 의학 응용 분야에 사용되었다. 최근 연구에서는 줄기 세포를 배양하고 뼈 또는 신경 조직의 세포로 분화하기 위해 PVDF 기반 스케폴드를 활용했다. 그러나 인간 다능성 줄기세포 (hPSC)의 장기 배양과 PVDF에서 심장 계통으로의 분화는 조사되지 않았다. 본 연구는 혼합 접착 단백질 (VNm)과의 융합을 통해 이 막에 비트로넥틴 유래 펩타이드를 전기 방사하고 고정하여 PVDF 나노 스케일 막의 제조를 설명한다. VNm으로 코팅된 PVDF 지지체에서 배양할 때, hPSC는 다능성 마커의 발현과 계능 무결성을 유지하면서 10개 이상의 계대 동안 안정적으로 증식하였다. 심장 분화를 위한 배양 조건에서, VNm이 있는 PVDF 지지체의 hPSC는 매트릭셀(Matrigel)에 비해 자발적으로 박동하는 콜로니와 상향 조절된 심장 관련 유전자를 더 많이 생성했다. 따라서 본 결과는 hPSC의 장기 배양과 심장 세포로의 분화를 위해 VNm으로 코팅된 PVDF 지지체의 유용성을 시사하여 재생 의학에서 그 응용을 확대한다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1. PVDF 나노-규모 지지체의 특성
 (A-B) PVDF 막에 있는 섬유의 대표적 SEM 이미지, 축적 막대: 10 μ m, (C) PVDF 섬유 직경의 분포.
- 도 2. 다양한 매트릭스 및 PVDF 지지체에서 hESC의 부착 및 성장
 (A-D) 저배율에서 AP 염색의 대표적인 이미지, (E-F) AP에 양성으로 염색된 콜로니의 대표적인 고배율 이미지, (I-L) 다양한 매트릭스에서 성장한 콜로니의 명시야 이미지. 콜로니는 PVDF 지지체에서 명확하게 보이지 않았기 때문에 점선으로 윤곽이 그려져 있음. 축적 막대: 200 μ m.
- 도 3. PVDF 지지체에서의 장기간 배양에서 다능성 마커 발현 및 증식의 안정적인 유지
 (A) 다능성 마커 유전자 (AP, OCT4 및 SOX2)의 발현은 10회 계대 후에 분명하였다, 축적 막대: 200 μ m, (B) hESC는 PVDF 지지체에서 10회 계대에 걸쳐 기존 매트릭스와 비슷한 속도로 증식하였다.
- 도 4. PVDF 지지체에서 배양한 hESC에서 다능성 마커 유전자의 높은 발현
 (A) 다양한 매트릭스에서 다능성 마커 유전자의 발현에 대한 FACS 분석, (B) 정량적 유전자 발현 분석은 PVDF 지지체 상의 hESC에서 다양한 매트릭스 상의 다능성 유전자와 유사한 발현을 보여 주었다.
- 도 5. 두께와 섬유 직경이 다른 PVDF 지지체에서 hESC의 성장
 (A) 다양한 PVDF 지지체에서 성장한 hESC의 형태 및 AP 면역 반응성. PVDF 지지체의 hESC는 2D 매트릭스의 hESC

보다 두껍고 더 작았다. 축척 막대: 100 μm . (B) 10회 계대 동안 다양한 PVDF 지지체에서 성장한 hESC의 정상 핵형.

도 6. VNm으로 코팅된 PVDF 지지체에서 hESC의 심장 분화

(A) 심장 분화 조건에서 배양된 hESC 콜로니의 형태. 축척 막대: 100 μm . (B) 다양한 매트릭스에서 자발적으로 박동하는 콜로니의 정량. (C) 심장 마커 유전자에 대한 정량적 유전자 발현 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

2. 시약 및 방법.

[0015]

2.1. PVDF 나노막의 제작

[0016]

DMF/아세톤 (40/60, Sigma-Aldrich에서 구입)에 용해된 15%의 PVDF (M.W. 534 K) 용액을 0.9 mm 외경의 노즐 팁과 연결된 주사기에 로드하고 유량을 펌프를 통해 600 $\mu\text{l h}^{-1}$ 으로 조정했다. 노즐 팁과 접지된 수집기 사이의 거리는 15cm로 고정하였다. 6 × 6 mm 크기의 실리콘 웨이퍼 조각을 수집기에 붙이고 세포 배양을 위한 기관으로 사용했다. 20분 동안 25 kV의 높은 전압을 적용함으로써 나노섬유 메쉬가 실온(20±2°C)에서 실리콘 기관 위에 성공적으로 증착되었다. 그 후, 샘플을 실온 (RT)에서 밤새 건조되도록 두었다.

[0018]

2.2 주사 전자 현미경

[0019]

PVDF 복합 나노섬유의 형태는 시료를 금으로 스퍼터링한 후 5kV의 가속 전압에서 주사 전자 현미경 (SEM, S-4300, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. 나노 섬유 직경은 Image-J 소프트웨어 (Madison, WI, USA)를 사용하여 분석하였다. 평균 섬유 직경 및 기공 크기는 다양한 이미징 스케일 (50 μm , 10 μm 및 1 μm)에서 섬유 경계를 통한 길이로 수동으로 측정하였다.

[0021]

2.3 DNA 플라스미드의 구축 및 변형된 펩티드의 정제

[0022]

우리는 Cha et al.(Hwang, Sim, & Cha, 2007)에 의해 기술된 바와 같이 fp-1로 구성된 재조합 비트로넥틴 펩티드-MAP 융합 단백질 (VNm)을 제조하였다. 융합 단백질은 fb-5의 각 말단에 fb-1의 테카펩티드 반복이 있는 MAP (해당 DNA 구성은 fb-151로 지칭됨) 및 MAP의 C-말단에 결합되고 hPSC-지지 활성이 이전에 입증된 비트로넥틴에서 유래된 해파린 결합 펩티드를 포함하도록 설계되었다 (Klim et al., 2010) (표 1). 대장균 (E. coli) 균주 RosettaGami™ (DE3) (Novagen, Darmstadt, Germany)를 사용하여 재조합 펩티드를 생산했다. 형질 전환 후, 대장균은 50mg/mL 암피실린이 함유된 성장 배지로 14L 발효기 (Fementec, Cheongwon, Korea)에서 37°C, 500 rpm에서 배양하였다. 세포 밀도가 7-10의 OD₆₀₀에 도달하면 이소프로필-b-D-티오갈락토피라노시드 1 mM (최종 농도)을 배양액에 첨가하여 융합 단백질의 형성을 유도했다. 융합 단백질 함유 세포는 4°C에서 10분 동안 6000 rpm에서 원심분리하여 수확하였다. 세포 펠렛을 증류수에 재현탁하고 고압 균질화기로 1000 bar (Picomax, Seongnam, Korea)로 파괴했다. 봉입체는 4°C에서 10분 동안 9000 rpm으로 원심분리하여 회수하고 25% 아세트산에 재현탁하여 기능성 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 추출했다. 다음으로 추출 용액을 4°C에서 10분 동안 9000 rpm으로 원심분리하였다. 수집된 상층액의 pH를 NaOH를 이용하여 12.5로 조정한 후 4°C에서 10분 동안 9000 rpm으로 원심분리하였다. 아세트산으로 중화시킨 후 침전된 융합 단백질을 원심 분리하여 회수하고 증류수에 재현탁하였다. 용액을 탈염하고 10-kDa 한외 여과 시스템 (Amicon / Millipore, Billerica, MA, USA)을 통해 농축하고 동결 건조시켰다. 비트로넥틴 유래 펩티드가 없는 MAP (unbound-MAP)도 동일한 절차를 사용하여 제조되었으며 여러 실험에서 음성 대조군으로 사용되었다.

[0024]

2.4 PVDF 지지체에 VNm 고정

[0025]

PVDF 막에 VNm을 코팅하기 전에 20mM 아세트산 나트륨 완충액 (pH 6.5)에 용해된 10mM (6.7 mg/mL) EDC (AK Scientific, San Francisco, CA, USA) 및 10 mM (8.7 mg/mL) NHS (AK Scientific)가 포함된 용액으로 실온 (RT)에서 30분 동안 전처리하여 활성화했다. 그 후, VNm (0.05 $\mu\text{g/mL}$)을 활성화된 PVDF 막에 첨가하고 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 증류수 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 3회 세척한 후 막을 실온 (RT)에서 완전히 건조시켰다. hESC 배양을 위해 VNm이 고정된 PVDF 막을 직경 30 mm의 원형으로 적절하게 절단하고 70% 에탄

올에 10분 동안 담가서 멸균하였다. 실온에서 완전히 건조시킨 후, 멤브레인을 6-웰 플레이트의 바닥에 놓았다.

- [0027] 2.5 인간 다능성 줄기 세포 배양, 심장 분화 및 핵형 분석
- [0028] 우리는 WiCell (WA09, WiCell, WI USA)의 H9 hESC 라인을 사용했다. hESC는 매트릭셀 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), vitronectin XFTM (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) 또는 VNm으로 코팅된 플레이트에서 37°C, 5% CO₂로 가습된 대기에서 mTeSR™ (Stemcell Technologies)로 배양되었다. 심장 분화를 위해 hPSC 콜로니를 제조업체의 지침에 따라 STEMdiff™ 심근 세포 분화 배지 (Stemcell Technologies)에서 배양하였다. 계층 안정성을 조사하기 위해 PVDF 지지체에서 10회 계대 후 표준 G-banding 기법을 사용한 핵형 분석을 수행했다 (GenDix, Inc. Seoul, Korea).
- [0030] 2.6 알칼리성 포스파타제 활성 시험
- [0031] 알카라인 포스파타제 (AP) 염색은 제조업체의 지침에 따라 AP 염색 키트 (Merk Millipore, Burlington, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 간단히 말해서, 세포를 실온에서 PBS 용액에 용해된 3.7% 포르말데히드로 고정하고 Fast Red Violet 용액 및 나프톨 AS-BI 인산염 용액으로 염색하였다. AP-양성 콜로니는 위상차 현미경 (Zeiss, Obekochen, Germany)으로 수동으로 계수하였다.
- [0033] 2.7 면역 형광 염색
- [0034] 세포를 4% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS로 고정시킨 다음 PBS에 용해된 0.5% Triton X-100으로 10분 동안 실온에서 투과시켰다. RT에서 10% 정상 염소 혈청 (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)으로 1시간 동안 블로킹 한 후, 샘플을 항-SOX2 (1:200, Abcam) 또는 항-OCT-4(1:400, Thermo Fisher Scientific)와 같은 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다. PBS로 세척한 후, Alexa Fluor 546 또는 488-접합된 2차 항체 Thermo Fisher Scientific)와 인큐베이션하여 세포에서 표적을 시각화시켰다. 핵은 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 대조 염색하였다. Zeiss LSM-510 공초점 현미경 (Zeiss, Obekochen, Germany)을 사용하여 이미지를 획득하였다.
- [0036] 2.8 형광유세포분석
- [0037] 세포를 1% BSA-PBS 용액에서 5분 동안 해리 및 차단한 다음 적절한 PE 접합 항체 (SSEA-4, Tra-1-60 및 OCT4, BD Biosciences)와 함께 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. 광범위한 세척 후, 세포를 500 µl의 1% BSA-PBS에 재현탁시키고 Guava®easyCyte™를 사용하여 계수하였다. 데이터는 Guava InCyte 소프트웨어 (Merk Millipore)로 분석하였다.
- [0039] 2.9 정량적 역전사 효소 중합 연쇄 반응에 의한 유전자 발현 분석
- [0040] 총 RNA는 TRIzol (Cosmo Genetech, Seoul, Korea)과 함께 LaboPass™ Kit를 사용하여 분리하였다. cDNA는 M-MLV 역전사 효소 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 분리된 총 RNA(1 µg)로부터 합성하였다. Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행했다. 정량적 유전자 발현은 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소 (GAPDH) 수준으로 정규화시켰다. 이 연구에 사용된 프라이머 서열은 표 2에 나열되어 있다.
- [0042] 2.10 통계 분석
- [0043] 모든 실험은 세 번 수행하였으며 데이터의 평균±표준 편차 (SD) 계산은 Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)으로 수행하였다. 통계 분석은 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 수행하였다. 확률 값은 P값 <0.05에서 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0046] 3. 결과

[0047] 3.1 PVDF 지지체의 특성

[0048] 이 연구에서 우리는 전기 방사를 통해 200 nm ("A 형")과 700 nm ("B 형")의 두 가지 직경을 가진 나노 스케일 PVDF 섬유의 막 지지체를 생산하고 사용했다. 주사 전자 현미경(SEM)에 의한 형태학적 검사는 각 지지체가 무작위적이고 균질한 분포에서 상대적으로 일정한 직경을 가진 섬유로 구성되어 있음을 보여 주었다 (도 1A 및 B). 섬유 사이에 형성된 기공은 연속적으로 연결되어 있었다. PVDF 비드(bead)의 형성은 거의 관찰되지 않았다. A형 지지체의 섬유는 B형 지지체의 섬유에 비해 중심이 200 nm에 있는 넓은 범위의 직경으로 측정되었다(도 1C). 유사한 형태학적 특징이 VNm 고정 후 SEM 하에서 관찰되었으며 (데이터는 표시하지 않음), 이는 VNm 코팅을 사용한 표면 변형이 PVDF 나노막의 무결성을 변경하지 않았음을 나타낸다.

[0050] 3.2 VNm으로 코팅된 PVDF 지지체에 인간 PSC 접착

[0051] 우리는 먼저 배양 플레이트에서 hESC의 부착 및 성장을 지원하는 VNm의 능력을 평가했다. Matrigel 및 비트로넥틴에서 파생된 상용 제노프리(xeno-free) 세포 배양 매트릭스인 비트로넥틴-XF 코팅에서와 같이, 상용 무피더(feeder-free) 배지(mTeSR)로 VNm 코팅된 플레이트에서 배양할 때 hPSC는 잘 부착되고 안정적으로 성장하여 콜로니를 형성하였으며(도 2J 및 K), 비트로넥틴 유래 펩타이드가 MAP와 융합될 때 기존의 매트릭스뿐만 아니라 세포의 부착을 지원함을 확인하였다. 이후 VNm이 코팅된 PVDF 지지체에서 hESC를 배양하고(도 2D, H, L, 세포 이미지는 두께가 5 μm인 B형 막에서 획득함), 그 형태를 배양 용기 바닥에 VNm이 코팅된 다른 매트릭스에서의 세포 형태와 비교했다 (도 2D로 표시). hPSC 콜로니의 전형적인 둥근 형태는 막의 불투명한 특성으로 인한 어려움에도 불구하고 광학 현미경으로 관찰했을 때 VNm 코팅된 PVDF 지지체에서 분명했다 (도 2L). PVDF 지지체가 hPSC의 부착 및 성장을 얼마나 잘 지원하는지 정성적으로 조사하기 위해 알칼리성 포스파타제 (AP) 염색을 수행했다. 결과적으로 AP 염색은 VNm이 있는 PVDF 지지체에서 hPSC의 전형적인 형태를 명확하게 시각화했으며, 이는 다른 기존 2D 배양 조건에서 성장한 것과 구별할 수 없었다 (도 2A-H). 이러한 결과는 우리가 더 오랜 기간 동안 세포를 더 배양하도록 유도했다.

[0053] 3.3 PVDF 지지체에서 hPSC의 장기 유지

[0054] 장기 배양에서 미분화 상태를 안정적으로 유지하는 것은 새로운 배양 플랫폼에서 해결해야 하는 가장 중요한 속성 중 하나이다. hPSC의 장기 유지를 지원하는 VNm 코팅 PVDF 지지체의 능력을 조사하기 위해 우리는 이들 세포를 10회 계대에 걸쳐 계속 배양했다. 여러 번의 계대 동안 세포는 계속해서 성장하고 hPSC 콜로니의 전형적인 모양을 유지했다 (도 3A). VNm에서만 또는 VNm으로 코팅된 PVDF 지지체에서 성장한 세포의 배가 시간은 어느 정도 변동했지만 다른 조건과 큰 차이는 없었고 계대에 따라 감소하거나 증가하지 않았다 (도 3B). 면역화학적 분석은 형태학적 관찰과 일관된 결과를 보여 주었다; 미분화 hPSC에 대한 마커인 OCT4 및 SOX2에 대한 면역 반응성은 대부분의 콜로니 내에서 분명하게 나타났고, hPSC의 안정적인 유지를 보여 주며, 추가의 장기 배양에서 VNm 코팅된 PVDF 지지체에서 유의한 자발적 분화가 없음을 분명히 나타냈다. SSEA-4, Tra-1-60 및 OCT4를 포함한 다능성 마커에 대한 항체를 사용한 유세포 분석은 또한 대부분의 세포가 모든 마커에 대해 양성이라는 것을 보여 주어 면역 형광 염색 결과를 확증합니다 (도 4A). 마지막으로, 우리는 qRT-PCR로 다능성 마커의 발현을 조사하고 OCT4, SOX2, NANOG 및 cMYC의 전사 수준이 실험된 코팅 그룹간에 유의하게 다르지 않음을 관찰했다 (도 4B).

[0055] 이전 연구는 인공 지지체의 두께가 그 위에서 자라는 줄기 세포의 행동에 상당한 영향을 미친다는 것을 보여준다 (Uygun, Bou-Akl, Albanna, & Matthew, 2010). hPSC의 부착 및 형태에 대한 PVDF 지지체 두께의 영향을 테스트하기 위해 3 및 5 μm 두께의 PVDF 지지체 2 개를 제작하고 VNm으로 코팅했다. hPSC는 10계대 이상 기존 매트릭스가 코팅된 플레이트뿐만 아니라 두 지지체 모두에 부착하여 성장했다. 콜로니는 섬유의 직경과 지지체의 두께가 증가함에 따라 두꺼워지고 작아지는 경향이 있었지만 AP 염색은 테스트된 모든 VNm 코팅 PVDF 지지체에서 강한 반응성을 보여주었다 (도 5A). 핵형 분석은 막 두께와 섬유 직경에 관계없이 10계대에 걸쳐 염색체 이상이 없음을 보여 주었다 (도 5B). 이러한 결과는 VNm으로 코팅된 PVDF 지지체가 hPSC의 부착과 다회 계대 이상

안정적인 유지를 효율적으로 지원할 수 있음을 시사한다.

[0057] 3.4 PVDF 지지체에서 hPSC의 심근 분화

[0058] 고유한 기계적 강도와 압전 특성을 갖는 재료인 PVDF 나노섬유는 잠재적인 생체의학 응용을 위해 심근 세포를 성장시키는지 테스트되었다 (Liu, Wang, Zhao, & Du, 2014). 이전 연구에서도 비트로넥틴이 ESC의 심장 분화에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Heydarkhan-Hagvall et al., 2012). 두 요소가 동시에 플랫폼에 존재하기 때문에 VNm으로 코팅된 PVDF 지지체가 hPSC의 심장 분화를 촉진하는지 여부를 조사하였다. 우리는 분화를 위해 VNm으로 코팅된 섬유 직경 (A 유형 및 B 유형)이 다른 두 개의 PVDF 지지체를 사용했으며, hPSC를 시드하고 심장 분화 조건 하에서 분화하도록 유도했다 (시약 및 방법 참조). 8일 후, 여러 개의 소형(compact) 콜로니가 배양 웰에 나타났으며(도 6A), 그 중 일부는 자발적으로 박동하기 시작했다 (보충 비디오). 2주 동안의 분화에서 우리는 A형보다 B형 지지체에서 자발적으로 박동하는 콜로니를 더 관찰했지만(도 6B), Matrigel에서는 박동하는 콜로니는 거의 관찰되지 않았다. 정량적 유전자 발현 분석은 ACTN2, GATA4 및 TNNT2를 포함한 심장 특이적 마커 유전자가 대조군에 비해 PVDF 지지체의 세포에서 유의하게 상향 조절되었음을 보여 주며(도 6C), 심장 유전자의 상향 조절이 자발적으로 박동하는 콜로니의 수와 잘 연관되어 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 VNm이 있는 PVDF 지지체가 hPSC의 심장 분화에 강한 영향을 미치고 새로운 심장 분화 플랫폼으로의 잠재적인 사용을 제안함을 나타낸다.

[0061] 4. 토론

[0062] PVDF 및 PVDF 기반 폴리머는 많은 생물학적 및 생물 의학 분야에 사용되었다. 이들은 나노섬유 또는 세포 배양 및 조직 공학을 위한 정교한 마이크로 패턴을 생성하기 위해 쉽게 제작될 수 있고, 감마 방사선에 의해 멸균된 후에도 구조적 무결성을 유지할 수 있다 (Cardoso, Correia, Ribeiro, Fernandes, & Lanceros-Mendez, 2018). PVDF 지지체의 생체 적합성도 수년 동안 입증되었다: 그것은 생물학적으로 불활성이고 무독성이며 박테리아 감염에 내성이 있다 [30966197 (Cardoso et al., 2018)]. 최근 연구에 따르면 PVDF 기반 지지체는 hPSC를 배양하고 배양시 골 형성 분화에 대한 잠재력을 향상시키는 데 사용될 수 있다 (Mirzaei et al., 2019), 31250436 (Abazari et al., 2020). 그러나 PVDF 지지체만으로 hPSC의 장기 배양을 지지할 수 있는지 여부는 지금까지 조사되지 않았으며, 이는 PVDF의 소수성 및 세포에 대한 접촉을 제공할 수 있는 알려진 작용기가 부족하기 때문일 수 있다. hPSC의 낮은 결합 친화도를 수정하기 위해 본 연구는 hPSC의 부착 및 성장을 지원하는 능력이 잘 정의된 비트로넥틴에서 파생된 접착 펩타이드로 PVDF 나노막을 코팅하려고 시도했다 (Klim et al., 2010). 우리는 모든 표면에 부착할 수 있는 고유한 분자 특성을 활용하여 PVDF 지지체에 MAP와 융합된 펩티드 변이체를 고정하였다 (Lin et al., 2007).

[0063] 비트로넥틴은 혈청과 ECM에 풍부한 헤모팩신 계열의 당단백질이다. 글리코사미노글리칸 및 콜라겐을 포함한 ECM의 여러 파트너와 상호작용할 수 있으며, 세포의 부착 및 이동에 필수적인 역할을 하는 아르기닌-글리신-아스파르테이트 (RGD) 모티프를 통해 원형질막의 인테그린 수용체에 결합할 수 있다 (Schvartz, Seger, & Shaltiel, 1999). 일련의 연구에서 비트로넥틴이 hPSC의 장기 유지를 지원하는 유망한 ECM 구성 요소로 확인되었다. 최근 연구에 따르면 VTN-NC라고 하는 비트로넥틴 변이체는 완전히 정교한 배양 조건에서 hPSC의 부착 및 성장을 지원할 수 있다 (Chen et al., 2011). 기능적인 N- 및 C- 말단 도메인 (즉, 각각 소마토메디안 B (somatomedin B) 및 V10 도메인)의 부재에도 불구하고, 이 변이체는 hPSC 배양 및 심지어 iPSC 유도를 위한 ECM 역할을 충분히 수행했다. 이는 비트로넥틴 변이체가 여전히 hPSC 표면의 인테그린과 상호 작용하는 데 필수적으로 사용되는 N-말단 근처에 RGD 모티프를 포함하기 때문에 가능할 수 있다. 또한, 또 다른 주요 연구에서는 hPSC의 부착 및 성장을 지원하는 새로운 기질로 비트로넥틴에서 유래한 헤파린 결합 펩티드 (즉, GKKQRFHRNRKG)- 이 연구에서 채택한 것과 동일한 펩티드 모티프를 확인했다 (Klim et al., 2010). 이 펩티드에는 RGD 모티프가 없지만 세포 표면의 글리코사미노글리칸에 결합하여 hPSC의 안정적인 확장을 성공적으로 지원한다. 인간 비트로넥틴의 헤파린 결합 서열은 조직화된 세포 세포 골격 및 국소 부착 부위의 형성에 관여하는 것으로 밝혀졌으며 (Chillakuri, Jones, & Mardon, 2010), 이러한 활성은 hPSC의 안정적인 부착 및 확장에 기여할 수 있다. 특히, 원래의 논문에서, 헤파린 결합 모티프에 대한 hPSC의 부착 및 안정된 확장은 Rho-연관 단백질 키나제 (Rho-associated protein kinase, ROCK) 억제제의 존재에 의존하며, ROCK 억제는 순환 RGD 모티

프와의 조합된 제시에 의해 대체될 수 있다 (Klim et al., 2010). 놀랍게도 VNm으로 코팅된 PVDF 지지체에서 hPSC의 배양에는 ROCK 억제제의 지속적인 보충이 필요하지 않았다. 우리 시스템이 ROCK 억제 없이 hPSC의 안정적인 성장을 지원할 수 있는 이유는 아직 명확하지 않다. 그러나 우리는 PVDF 나노섬유와의 조합이 조직화된 세포 세포 골격의 유지와 헤파린 결합 서열에 의한 국소 접착 형성을 상승시켰다고 추측한다.

[0064] PVDF는 가장 일반적인 압전 재료 중 하나이다. 최근 연구에서 PVDF 기반 나노복합체의 압전 효과가 심근 세포의 증식과 분화에 긍정적인 영향을 미치므로 심근 경색을 치료하기 위한 심장 패치로 활용될 수 있다는 흥미로운 가설이 제시되었다 (Arumugam, Srinadhu, Subramanian, & Nallani, 2019). 다른 여러 연구에서도 전기적 활성 물질이 심혈관계, 심지어 신경계 및 골격계에서 유래한 줄기 세포의 발달을 가속화한다는 증거를 제공했다 (Lins et al., 2017) (Solmaz, 2018). 우리의 PVDF 지지체가 hPSC의 부착을 향상시키기 위해 변형되었기 때문에 우리의 배양 플랫폼이 hPSC의 심장 분화를 촉진하는 데 사용될 수 있다는 가설을 조사하였다. 심장 분화 조건 하에서, 우리는 Matrigel에 비해 비트로넥틴 펩티드로 코팅된 PVDF 지지체의 세포에서 박동 콜로니의 수와 심장 마커 유전자의 발현이 증가하는 것을 관찰했다. 이러한 고무적인 결과에도 불구하고 PVDF 나노막 단독으로는 hPSC의 부착을 비효과적으로 지원하기 때문에 PVDF 지지체 및 비트로넥틴의 고정화 펩티드가 심장 분화 촉진에 미치는 개별 효과를 분리하기가 어려웠다. 이러한 분화 촉진 활성이 PVDF의 생물물리적 특성과 비트로넥틴의 생화학적 활성의 결합된 효과의 결과라고 가정하는 것이 타당하다 (Tallawi et al., 2015).

[0065] 결론적으로, 단일 플랫폼에서 PVDF 지지체의 생체 적합성과 강력한 비트로넥틴 변이체 사용의 결합은 hPSC 배양에 적합한 미세환경을 제공하는, 무피더 및 이종성분이 없는 정교한 3차원 배양 플랫폼을 가능하게 했다. 이후 PVDF 지지체가 어떻게 심장 분화를 촉진하는지 더 자세한 분자 메커니즘이 설명되어야 하지만, 이 연구는 적절한 배양 조건에서 배양 플랫폼을 변경하지 않고도 hPSC를 심장 세포로 분화하는 데 사용할 수 있는 플랫폼을 제공할 수 있다.

[0067] 참고문헌

[0068] Abazari, M. F., Soleimanifar, F., Amini Faskhodi, M., Mansour, R. N., Amini Mahabadi, J., Sadeghi, S., . . . Zare Karizi, S. (2020). Improved osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells cultured on polyvinylidene fluoride/collagen/platelet-rich plasma composite nanofibers. *J Cell Physiol*, 235(2), 1155-1164. doi:10.1002/jcp.29029

[0069] Ardeshirylajimi, A., Ghaderian, S. M., Omrani, M. D., & Moradi, S. L. (2018). Biomimetic scaffold containing PVDF nanofibers with sustained TGF-beta release in combination with AT-MSCs for bladder tissue engineering. *Gene*, 676, 195-201. doi:10.1016/j.gene.2018.07.046

[0070] Arumugam, R., Srinadhu, E. S., Subramanian, B., & Nallani, S. (2019). beta-PVDF based electrospun nanofibers - A promising material for developing cardiac patches. *Med Hypotheses*, 122, 31-34. doi:10.1016/j.mehy.2018.10.005

[0071] Cardoso, V. F., Correia, D. M., Ribeiro, C., Fernandes, M. M., & Lanceros-Mendez, S. (2018). Fluorinated Polymers as Smart Materials for Advanced Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*, 10(2). doi:10.3390/polym10020161

[0072] Celiz, A. D., Smith, J. G., Langer, R., Anderson, D. G., Winkler, D. A., Barrett, D. A., . . . Alexander, M. R. (2014). Materials for stem cell factories of the future. *Nat Mater*, 13(6), 570-579. doi:10.1038/nmat3972

[0073] Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., . . . Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*, 8(5), 424-429. doi:10.1038/nmeth.1593

[0074] Chillakuri, C. R., Jones, C., & Mardon, H. J. (2010). Heparin binding domain in vitronectin is required for oligomerization and thus enhances integrin mediated cell adhesion and spreading. *FEBS Lett*, 584(15), 3287-3291. doi:10.1016/j.febslet.2010.06.023

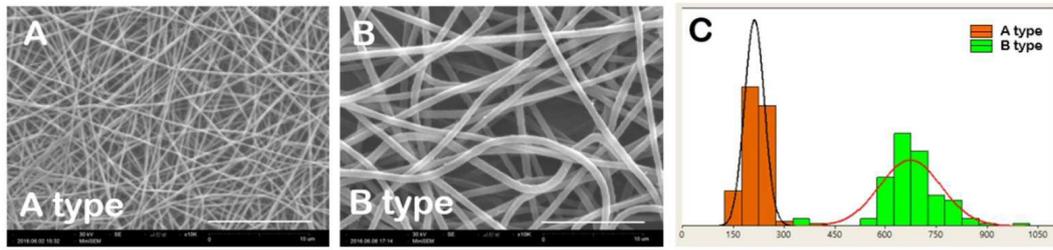
[0075] Heydarkhan-Hagvall, S., Gluck, J. M., Delman, C., Jung, M., Ehsani, N., Full, S., & Shemin, R. J. (2012). The effect of vitronectin on the differentiation of embryonic stem cells in a 3D culture

system. *Biomaterials*, 33(7), 2032-2040. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.065

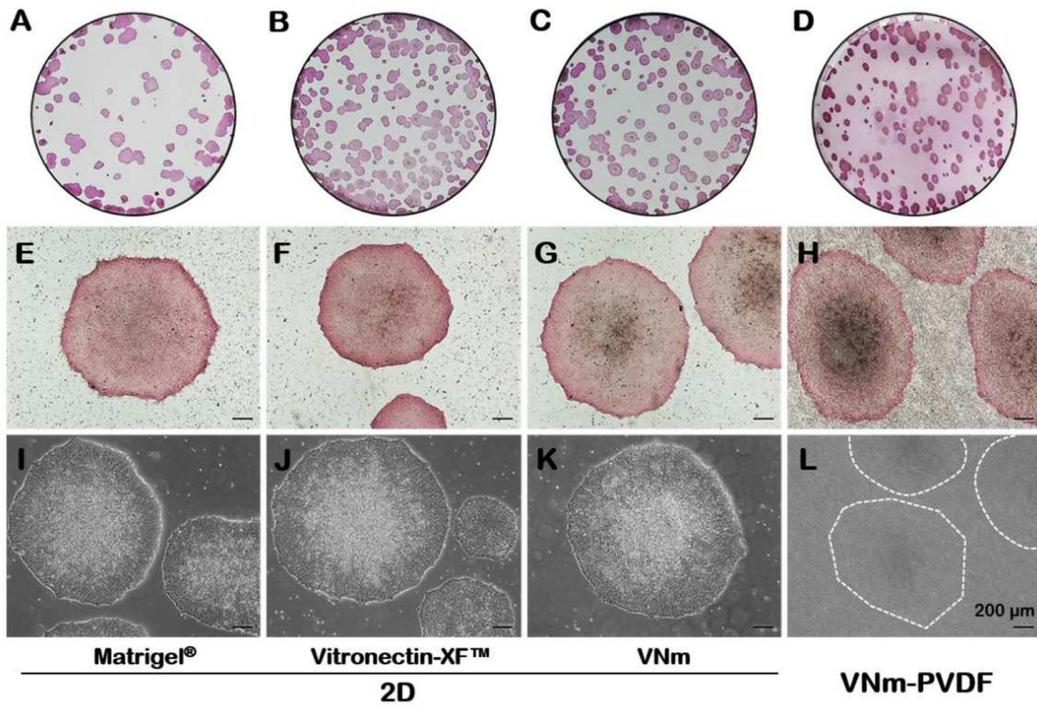
- [0076] Hwang, D. S., Sim, S. B., & Cha, H. J. (2007). Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. *Biomaterials*, 28(28), 4039-4046. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.028
- [0077] Klim, J. R., Li, L., Wrighton, P. J., Piekarczyk, M. S., & Kiessling, L. L. (2010). A defined glycosaminoglycan-binding substratum for human pluripotent stem cells. *Nat Methods*, 8 7(12), 989-994. doi:10.1038/nmeth.1532
- [0078] Krishna, L., Dhamodaran, K., Jayadev, C., Chatterjee, K., Shetty, R., Khora, S. S., & Das, D. (2016). Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Res Ther*, 7(1), 188. doi:10.1186/s13287-016-0440-y
- [0079] Laroche, G., Marois, Y., Guidoin, R., King, M. W., Martin, L., How, T., & Douville, Y. (1995). Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: from polymeric raw material to monofilament vascular suture. *J Biomed Mater Res*, 29(12), 1525-1536. doi:10.1002/jbm.820291209
- [0080] Lim, S. H., & Mao, H. Q. (2009). Electrospun scaffolds for stem cell engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(12), 1084-1096. doi:10.1016/j.addr.2009.07.011
- [0081] Lin, Q., Gourdon, D., Sun, C., Holten-Andersen, N., Anderson, T. H., Waite, J. H., & Israelachvili, J. N. (2007). Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 3782-3786. doi:10.1073/pnas.0607852104
- [0082] Lins, L. C., Wianny, F., Livi, S., Dehay, C., Duchet-Rumeau, J., & Gerard, J. F. (2017). Effect of polyvinylidene fluoride electrospun fiber orientation on neural stem cell differentiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105(8), 2376-2393. doi:10.1002/jbm.b.33778
- [0083] Liu, X., Wang, X., Zhao, H., & Du, Y. (2014). *Myocardial cell pattern on piezoelectric nanofiber mats for energy harvesting*. Paper presented at the 14th International Conference on Microand Nano-Technology for Power Generation and Energy Conversion Applications, PowerMEMS 2014.
- [0084] Madl, C. M., & Heilshorn, S. C. (2018). Engineering Hydrogel Microenvironments to Recapitulate the Stem Cell Niche. *Annu Rev Biomed Eng*, 20, 21-47. doi:10.1146/annurev-bioeng-062117-120954
- [0085] Mirzaei, A., Moghadam, A. S., Abazari, M. F., Nejati, F., Torabinejad, S., Kaabi, M., . . . Saburi, E. (2019). Comparison of osteogenic differentiation potential of induced pluripotent stem cells on 2D and 3D polyvinylidene fluoride scaffolds. *J Cell Physiol*, 234(10), 17854-17862. doi:10.1002/jcp.28415
- [0086] Schwartz, I., Seger, D., & Shaltiel, S. (1999). Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(5), 539-544. doi:10.1016/s1357-2725(99)00005-9
- [0087] Solmaz, O. A. (2018). Diagnostic importance of CD56 with fine-needle aspiration cytology in suspected papillary thyroid carcinoma cases. *Cytojournal*, 15, 3. doi:10.4103/cytojournal.cytojournal_42_17
- [0088] Tallawi, M., Rosellini, E., Barbani, N., Cascone, M. G., Rai, R., Saint-Pierre, G., & Boccaccini, A. R. (2015). Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *J R Soc Interface*, 12(108), 20150254. doi:10.1098/rsif.2015.0254
- [0089] Uygun, B. E., Bou-Akl, T., Albanna, M., & Matthew, H. W. (2010). Membrane thickness is an important variable in membrane scaffolds: Influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells. *Acta Biomater*, 6(6), 2126-2131. doi:10.1016/j.actbio.2009.11.018

도면

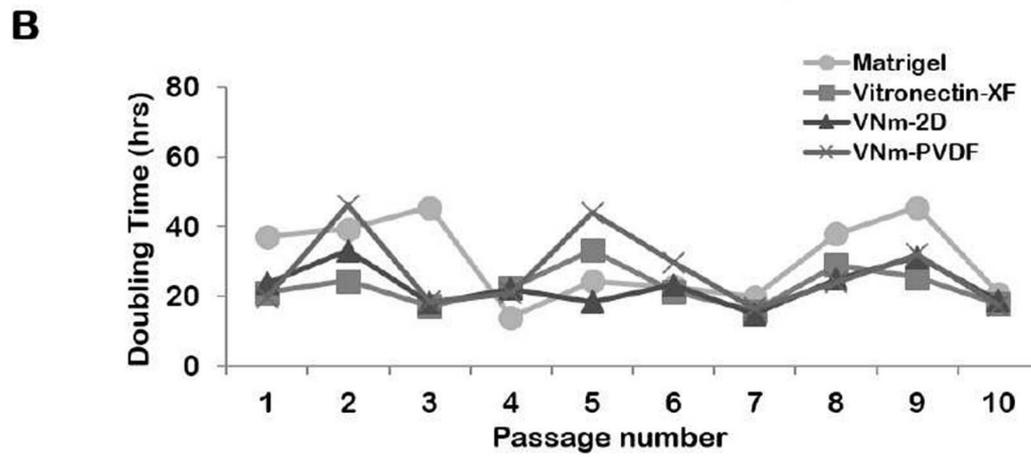
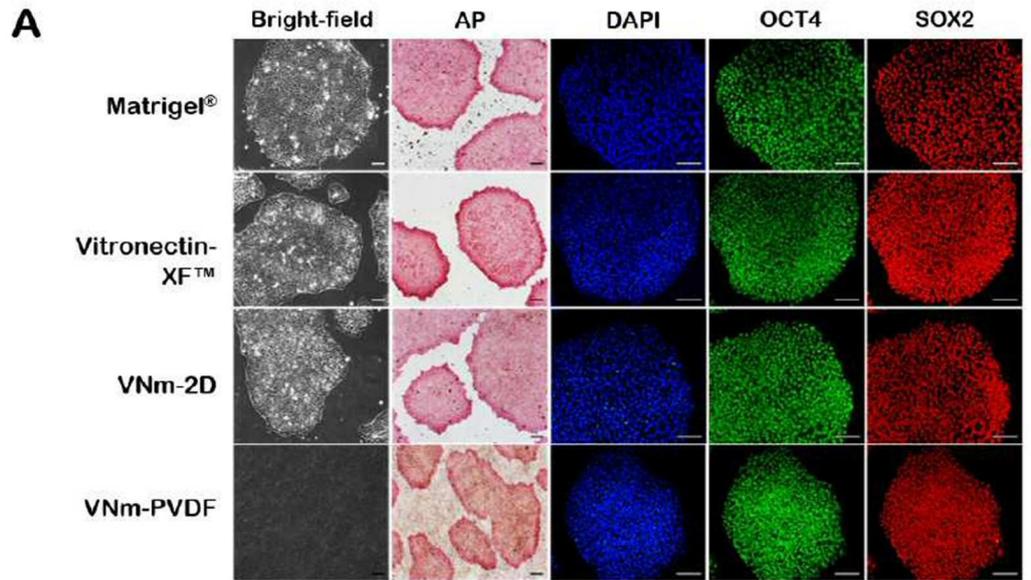
도면1



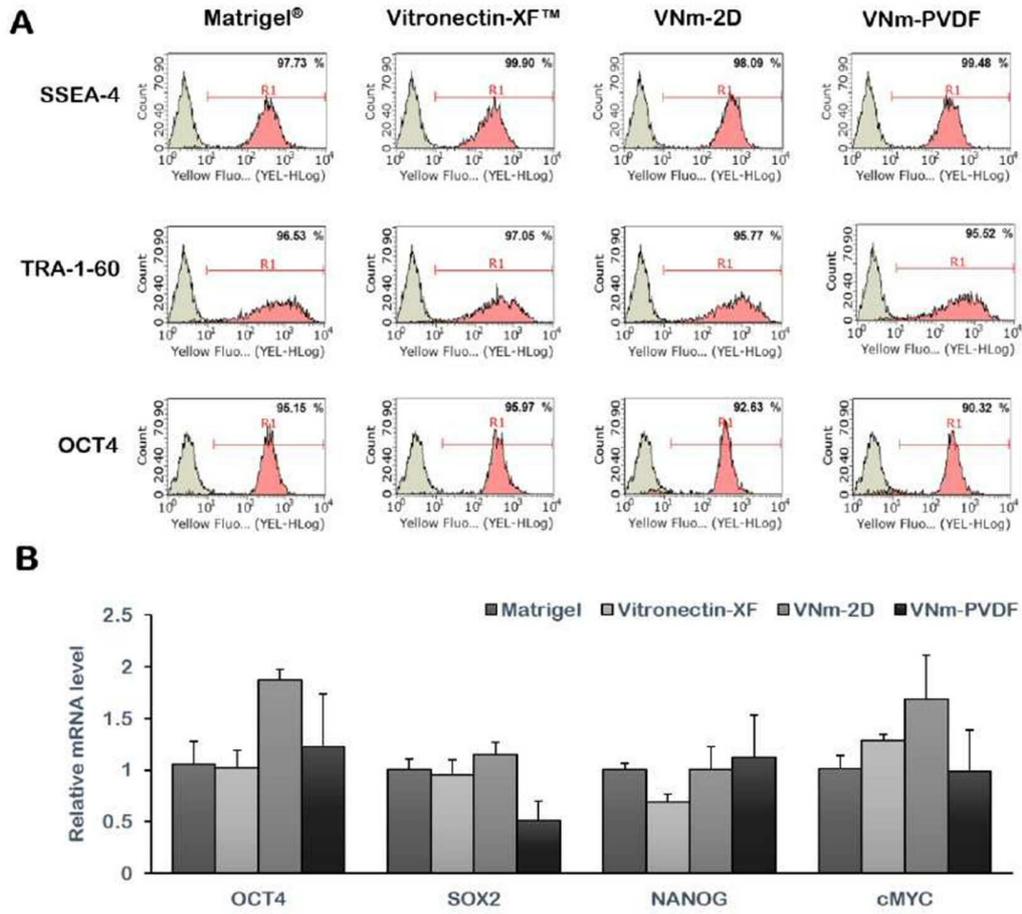
도면2



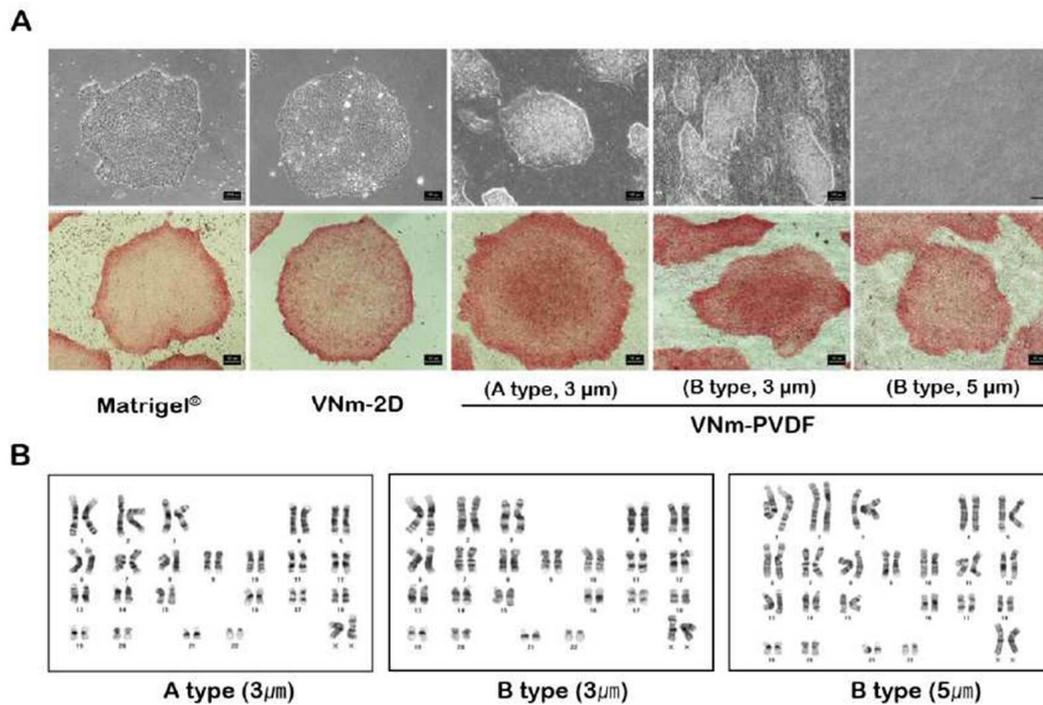
도면3



도면4



도면5



도면6

