

http://kosombejams.or.kr
http://kosombemeeting.or.kr



대한의용생체공학회 2021 온라인 춘계학술대회

Frontiers in Digital Healthcare

2021.05.12(수)~05.14(금)



2021
대한의용생체공학회
춘계학술대회

발표순서	발표자	소속	초록제목
P-061	김명지	포항공과대학교	3D bioprinting of functional pancreatic tissue constructs using stem cell-derived insulin producing beta cells and endothelial cells
P-062	주지인	고려대학교 바이오공학과 고려대학교 정밀보건과학융합연구소	광촉매와 빛을 통해 약물 방출 시점을 조절하는 micro reservoir-based system
P-063	장현정	인제대학교 나노융합공학과	Detection of Ovarian Cancer Biomarker Using Carbon Dot-Aptamer Sensor
P-064	조혜연	연세대학교 의공학과	폴리머 기반 Stereocomplex 구조를 이용한 3 마이크로 디스크 입자 제작 및 안정성 평가
P-065	민창희	서울대학교 공과대학 협동과정 바이오엔지니어링 전공	Development of polyethylene glycol coated MCM-48 nanoparticles for oral vaccine delivery
P-066	최선민	연세대학교 보건과학대학 의공학부	난소암 영상 기반 수술을 위한 암 표적 근적외선 나노입자
P-067	수수미타 아라알	연세대학교 의공학과	Influence of Macrophage Membrane Coated Discoidal Polymeric Particles on Phagocytosis
P-068	김가희	연세대학교 의공학과	화장품 경피 흡수평가를 위한 피부모사 팬텀 제작
P-069	박상효	연세대학교 의공학과	폐암 치료용 Discoidal Polymeric Particles에 관한 연구
P-070	최영진	경북대학교대학원 의용생체공학과	콜라겐합성 촉진제와 항산화제가 포함된 상처 드레싱 연구
P-071	박진섭	전북대학교 대학원 헬스케어공학과	전신진동을 결합한 운동 프로그램이 고령자의 하지 근력에 미치는 영향
P-072	유예담	금오공과대학교 IT융복합공학과	EAD를 유발하는 약물 예측을 위한 심장세포의 전기적 지표 검증
P-073	김정길	건국대학교 바이오메디컬공학과	입력센서 추출 보행변인을 통한 낙상 예측 분석
P-074	유진희	포항공과대학교 시스템생명공학과	고주파 초음파를 이용한 단일 적혈구의 전단 탄성 특성 측정
P-075	김도연	경북대학교 대학원 의용생체공학과	외이도 진동 자극 발생장치의 완충제 무게를 고려한 공진대역의 상관관계 연구
P-076	곽기영	전북대학교 공과대학 바이오메디컬공학부	평지보행 동안 인지감소 고령자의 서포트 모멘트와 지면반발력
P-077	코스틱 에밀리아	전북대학교 대학원 헬스케어공학과	Gait and vestibular function parameters as prodromal markers of cognitive decline in elderly
P-078	정다운	금오공과대학교	Application of Artificial Neural Network for Prediction of Change in Ion Channel Conductance using Difference in Action Potential Shapes
P-079	김지원	건국대학교 바이오공학과 전북대학교 헬스케어공학과	고령자들의 정적 자세 균형 검사시 자세동요의 주파수 특성 분석
P-080	김의한	연세대학교 기계공학과	멀티포트 공간섭계 기반 망막선택적치료 선량측정법
P-081	조은정	광주과학기술원	Development of a non-destructive spectroscopic method to identify colored spoiled beef

3D 바이오 프린팅 기술을 이용한 줄기세포 유래 인슐린 분비세포 및 혈관세포로 구성된 기능성 췌장 조직체의 개발

김명지^{1*}, 조승연², 황동규¹, 장진아^{1,2,3}

포항공과대학교 시스템생명공학부¹

포항공과대학교 IT융합공학과²

포항공과대학교 기계공학과³

3D bioprinting of functional pancreatic tissue constructs using stem cell-derived insulin producing-beta cells and endothelial cells

Myungji Kim^{1*}, Seungyeon Cho², Dong Gyu Hwang¹, Jinah Jang^{1,2,3,4}

¹School of Interdisciplinary Bioscience and Bioengineering, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Korea

²Department of Convergence IT Engineering, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Korea

³Department of Mechanical Engineering, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Korea

*rinakj@postech.ac.kr

Abstract

3D bioprinting technology allows fabrication of cell-laden configurations by incorporation of large numbers of cells and extracellular components into desired architecture. Pancreatic islet is comprised of multiple types of endocrine cells and vascular cells in an aggregate form and surrounded by extracellular niche. In this regard, we developed pancreatic tissue-specific extracellular matrix (ECM) material to recapitulate peri-islet niche as a first step to fabricate functional pancreatic tissue constructs. Moreover, human embryonic stem cells-derived insulin producing-beta cells and supporting cells such as human mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells were co-printed with aggregate printing method to mimic native islet-like composition and function. Established 3D human pancreatic tissue constructs can be used as a physiometric tissue platform or transplantable constructs to treat diabetes.

1. 연구 배경

당뇨는 췌장(pancreatic islet)내 인슐린을 분비하여 체내 혈당을 조절하는 베타 세포의 기능 장애로 인해 나타나는 만성 질환이다. 특히 1형 당뇨병은 자가 면역체계 시스템에 의한 베타 세포의 파괴로 인해 혈당조절능을 상실하게 되는 경우로 환자는 체외 인슐린 공급에 의존하여 혈당을 조절하게 된다. 그러나 인슐린 주사 및 인슐린 펌프와 같은 체외 인슐린 공급 시스템은 일시적으로 혈당조절을 가능하게 하며 궁극적으로 체내의 베타 세포가 인슐린을 분비하는 메커니즘으로 작용하지 않아 당뇨 완치에 있어서 한계가 있다[1]. 이러한 당뇨를 근본적으로 치료하기 위한 방법으로 건강한 췌도를 이식하는 연구가 진행되고 있으나 장기 공여자의 부족으로 안정적인 췌도의 공급이 어렵고 동종이식임에도 거부반응이 발생할 수 있어 평생 면역억제제 사용을 수반해야 하는 것으로 알려져 있다[1].

이를 극복하기 위해 줄기세포 유래 인슐린 분비세포 및 세포를 보호할 수 있는 하이드로젤(hydrogel)을 이용한 치료 기술이 개발되고 있다. 줄기세포 분화기술은 다량으로 세포를 공급할 수 있으며 표준화된 분화 프로토콜을 통해 일정한 인슐린 분비능을 갖는 세포를 생산할 수 있다는 장점을 갖는다. 그러나 분화한 세포의 경우 신생아의 췌도 수준으로 성숙도가 낮아 성인의 췌도 대비 글루코스 반응성이 떨어지는 경향이 있다. 이를 개선하기 위하여 혈관내피세포(vascular endothelial cell) 및 췌도를 감싸는 기질 세포(stromal cell)와 유사한 특성을 갖는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)를 함께 공배양(co-

culture)하여 분화한 인슐린 분비 세포의 성숙도를 높여주는 연구가 진행되고 있다[2]. 한, 3차원 하이드로젤 내에 인슐린 분비 세포를 봉입하여 세포-매트릭스의 상호작용(cell-matrix interaction)을 극대화하여 인슐린 분비능을 향상시키는 연구가 주목받고 있다. 이때 적용 가능한 대표적인 하이드로젤의 종류에는 세포외기질(extracellular matrix) 성분 기반의 콜라겐(collagen), 알지네이트(alginate), 피브린(fibrin) 등이 있으나 이러한 단일 성분의 하이드로젤은 실제 췌도 주변의 세포 외 환경(peri-islet extracellular environment)을 구현하기에는 한계가 있다. 이와 관련하여 표적 조직을 탈세포화(decellularization)하여 조직의 세포 성분을 제거하고 세포외기질 성분을 하이드로젤 형태로 만들어 인슐린 분비 세포 봉입에 적용하는 연구들이 진행되고 있다[3]. 하지만 단순히 세포와 하이드로젤을 섞어서 조직을 제작하는 경우, 표적 조직의 특이적인 구조와 기능을 모사하기에 어려움이 있다.

따라서, 본 연구에서는 췌장 조직 유래 세포외기질 성분으로 구성된 하이드로젤에 줄기세포 유래 인슐린 분비 세포와 혈관내피세포, 중간엽 줄기세포를 함께 봉입하여 바이오 잉크를 제조하고 바이오 프린팅 기술을 적용하여 실제 췌도의 구조와 크기를 모사하고자 하였으며 췌도와 췌도 사이의 상호작용 역시 극대화시킬 수 있는 배열 방식을 도입하여 췌장 조직체를 개발하였다. 또한, 인슐린 분비 세포 단독으로 프린팅한 경우와 인슐린 분비 세포의 기능을 향상시켜줄 수 있는 세포를 함께 프린팅한 경우를 비교하여 기능성 췌장조직의 제작조건을 최적화하였다.

2. 연구 방법

총 4단계를 포함하는 분화 프로토콜을 이용하여 발달신경로를 조절해줄 수 있는 다양한 인자를 포함하는 배지를 이용하여 줄기세포를 내배엽(definitive endoderm) 세포로 분화를 유도하고 췌장 전구체 세포단계를 거쳐 인슐린 분비 세포로 분화하였다. 분화 이후, 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 베타 세포와 관련한 대표적인 전사인자인 PDX1(pancreatic and duodenal homeobox1), NKX6.1(NK6 homeobox1)와 인슐린 분비능을 평가할 수 있는 지표인 C-peptide(connecting peptide)의 발현을 분석하였으며 GSI(Glucose stimulated insulin secretion)를 통해 실시간 인슐린 분비능을 평가하였다. 분화한 인슐린 분비 세포와 혈관내피세포, 중간엽 줄기세포를 2 w/v% 농도의 탈세포화 된 췌장 조직 유래 드로젤에 1:1 비율로 봉입하여 바이오잉크를 제조하였다. 3차원 바이오 프린터를 이용하여 PCL 로 고분자 프레임을 프린팅하고 프레임 내부에 세포가 없는 췌장 조직 유래 하이드로젤을 프린팅한 다음 3가지 세포가 봉입된 바이오잉크를 20 kPa 로 실제 췌도의 형태인 구형의 응집체 형태로 프린팅하여 췌장 조직체를 개발하였다. 실제 체내에서 분리된 췌도를 배양하는 배지를 이용하여 제작된 췌장 조직체를 7일간 배양하고 Live/dead assay를 통해 세포 생존율을 검증하였으며 면역형광 염색법을 통해 인슐린 분비 세포 단독 조건과 공배양 조건을 비교하여 프린팅된 췌도의 형태 양상과 인슐린 발현을 정성적으로 검증하였다.

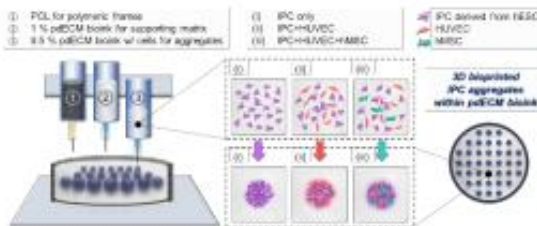


그림 1. 3차원 바이오 프린팅 기술을 이용한 기능성 췌장 조직체 개발 모식도

3. 연구 결과

그림 2는 유세포 분석을 통해 줄기세포로부터 분화한 인슐린 분비세포가 베타 세포 특이적 마커인 PDX1/C-peptide 및 NKX6.1/C-peptide의 동시 발현율이 각각 34.7%, 40.9% 로 나타남을 제시한다.

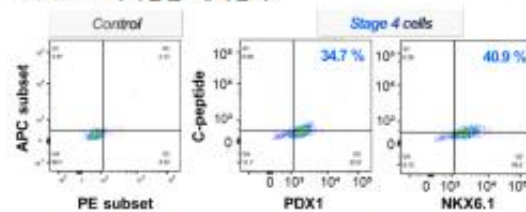


그림 2. C-peptide와 베타세포 관련 핵심 전사인자의 동시 발현을 보여주는 유세포 분석의 대표 플롯

분화한 인슐린 분비세포를 구형의 응집체 형태로 프린팅하기 위해 공압 및 바이오잉크의 농도를 달리하여 췌장 조직체 제작 공정을 최적화 하였다. 제작된 췌장 조직체를 체외에서 7일간 배양한 후 Live/dead assay를

진행한 결과 인슐린 분비 세포의 높은 생존율이 검증되었으며(데이터 나타내지 않음), 그림 3을 통해 인슐린 분비 세포 단독 프린팅 조건과 공배양 프린팅 조건을 면역형광 염색을 통해 비교하였을 때 공배양 프린팅 조건에서 혈관 관련 마커 및 인슐린의 발현이 두드러지게 나타났으며 프린팅된 췌도와 췌도간의 연결성을 관찰할 수 있었다.

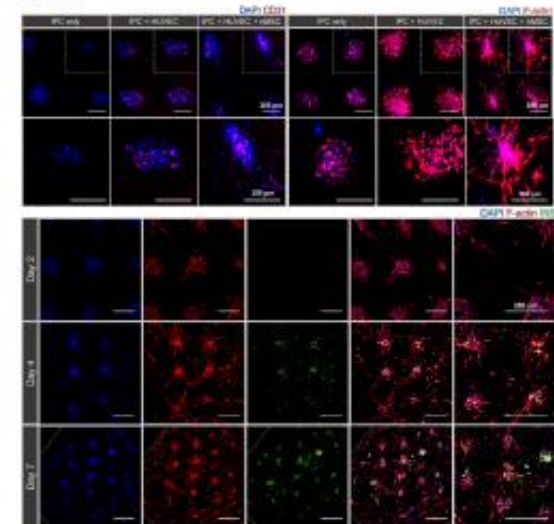


그림 3. 프린팅된 췌장 조직체의 배양 조건별 혈관 및 인슐린 발현의 비교 검증

해당 결과들을 바탕으로 줄기세포 유래 인슐린 분비세포 및 혈관세포, 중간엽 줄기세포로 구성된 췌장 조직체가 체외에서 안정적으로 인슐린을 분비할 수 있음을 정성적으로 확인하였으며 추후 체내 기능 평가를 통한 cross-validation 수행을 통해 당뇨 치료를 위한 고기능성 이식체로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

4. Acknowledgements

본 연구는 2020년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 (No.2020R1A6A1A03047902)과 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임. (2021R1A2C2004981)

5.참고 문헌

- [1] Esther Latres and Timothy J. Kieffer. "Navigating Two Roads to Glucose Normalization in Diabetes: Automated Insulin Delivery Devices and Cell Therapy." *Cell Metabolism*, Vol.29, 3, p545-563, 2019
- [2] Eiji Yoshihara and Ronald M. Evans. "Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes." *Nature*, Vol.586, p606-611, 2020
- [3] Jaewook Kim and Jinah Jang. "3D cell printing of islet-laden pancreatic tissue-derived extracellular matrix bioink constructs for enhancing pancreatic functions." *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 7, p1773-1781, 2019