

줄기세포와 마이크로 기술

이 종 민 서강대학교 기계공학과 석박사통합과정 | e-mail : caboera85@naver.com

정 봉 근 서강대학교 기계공학과 부교수 | e-mail : bchung@sogang.ac.kr

이 글에서는 최근에 전세계적으로 활발하게 연구가 진행되고 있는 마이크로플루이딕칩과 마이크로웰 기술들을 이용한 줄기세포 연구의 최신 연구동향들을 소개하고자 한다.

줄기세포는 자가재생 능력과 인체의 모든 세포나 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포를 말하며, 크게 배아줄기세포와 성체줄기세포로 나눌 수 있다. 배아줄기세포는 수정란의 세포분열을 통해 만들어진 배반포 내부의 내세포괴(inner cell mass)의 세포들을 말하며, 혈액과 피부, 그리고 뼈 등 모든 조직의 세포로 분화할 수 있다(J.A. Thomson 등, *Science* 1998, 282(5391): 1145-1147). 성체줄기세포는 인간의 배아를 다루는 것이 아니기 때문에 의학적, 생물학적으로 안전하며 생명윤리로부터 자유롭지만 얻을 수 있는 줄기세포의 수에 한계가 있다. 한편, 배아줄기세포는 무한대로 세포 분열을 할 수 있으며, 원하는 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 능력을 지니고 있기 때문에 줄기세포 기반의 치료나 다양한 조직공학 연구에 응용될 수 있지만, 윤리적 문제가 남아 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 유도만능줄기세포의 연구도 활발하게 진행되고 있다. 유도만능줄기세포는 체세포의 리프로그래밍(reprogramming)을 통해 얻어진 세포로서 성체세포를 활용하여 자신의 줄기세포로 원하는 조직으로 분화시킬 수 있는 배아줄기세포와 유사한 무한한 잠재력을 지니고 있다. 하지만, 기존의 줄기세포 배양방법에서는 줄기세포의 성장과 분화 조건을 최적화하기 위해 아직도 많은 제약들이 남아 있다. 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 바이오 MEMS (microelectro-

mechanical systems) 기술이 사용되고 있다. 본 연구진은 2010년 기계저널에 투고한 테마기획 마이크로유체 세포칩 기술의 최근 동향에서 마이크로 미세유체칩을 이용한 줄기세포 연구에 대하여 소개한 바 있다(이종민 등, *기계저널*, 2010, 50(11): 35-38). 따라서, 이 글에서는 2010년부터 현재까지 줄기세포 연구를 위한 마이크로플루이딕칩, 마이크로웰, 그리고 마이크로플루이딕칩과 마이크로웰을 동시에 이용한 최신 연구동향들을 소개하고자 한다.

마이크로플루이딕칩을 이용한 줄기세포 연구

최근 마이크로플루이딕칩 기술은 다양한 분야에서 연구가 활발하게 진행되고 있다. 마이크로플루이딕칩은 효율성과 생산성이 뛰어나며, 저비용으로 구현이 가능하다. 또한, 세포나 조직 연구에 적합한 마이크로 구조체를 제작할 수 있기 때문에 미세환경을 정밀하게 조절할 수 있다. 줄기세포의 증식과 분화는 성장인자, 신호물질 등 미세환경의 영향을 크게 받으므로 미세 환경을 조절하는 것이 중요하다. 최근에, 마이크로 밸브를 이용하여 배아줄기세포에서 혈관내피세포로 분화를 유도하기 위한 마이크로플루이딕칩이 개발되었다(J.M. Lee 등, *Electrophoresis*, 2011, 32(22): 3133-3137) (그림 1). 반도체 제조 기술인 포토리소그래피(photolitho-

graphy) 기술을 이용하여 마이크로 밸브를 포함한 4×4 마이크로 챔버 어레이 시스템을 개발하였다. 마이크로플루이딕칩의 채널은 공기 채널에 의해 제어될 수 있으며, 마이크로 챔버 어레이안에 마이크로 필라 구조체를 사용하여 배아줄기세포를 균일하게 배양하였다. 이 시스템에서, 가로 밸브는 세포 배양 미디엄의 확산을 조절하며 세로 밸브는 세포의 균일한 배양을 위해 사용되었다. 또한, Computational Fluid Dynamics 컴퓨터 모델링을 통해서 마이크로 챔버 어레이의 마이크로 필라 안쪽에는 세포배양 미디엄 유체에 의해서 형성된 전단응력(shear stress)이 상당히 작다는 것을 확인하였다. 따라서, 전단응력이 작은 4×4 마이크로 챔버 어레이 안에서 배아줄기세포를 6일 동안 배양하고, 내피세포로의 분화를 성공적으로 유도함으로써 마이크로플루이딕칩에서 배아줄기세포를 배양하고 분화를 유도하는 조건을 최적화하였다. 또한, 마이크로 밸브를 이용하여 배아줄기세포에서 신경세포로 분화를 유도하기 위한 마이크로플루이딕칩이 개발되었다(J.M. Lee 등, *Electrophoresis*, 2013, 34(13): 1931-1938). 마이크로플루이딕칩안에 단일 세포의 고정 가능성이 가능하도록 4×4 마이크로 챔버 어레이 안에 안장 구조의 마이크로 필라를 제조하였다. 마이크로 챔버는 바깥쪽 마이크로 필라와 안쪽 마이크로 필라로 구성되어 있다. 바깥쪽 마이크로 필라는 전단응력을 최소화해 주고, 안쪽의 마이크로 필라는 세포를 고정시킬 수 있다. 또한, 유체 역학의 저항으로 인한 안쪽 마이크로 필라에서의 세포의 고정 효율과 세포 배양 미디엄의 유속에 따라서 세포의 고정효율이 다르다는 것을 관찰하였다. 결과적으로, 이중 마이크로 필라 기반의 4×4 마이크로 챔버 어레이 안에서 배아줄기세포를 6일 동안 배양하여 배아줄기세포에서 신경세포로의 분화를 유도하

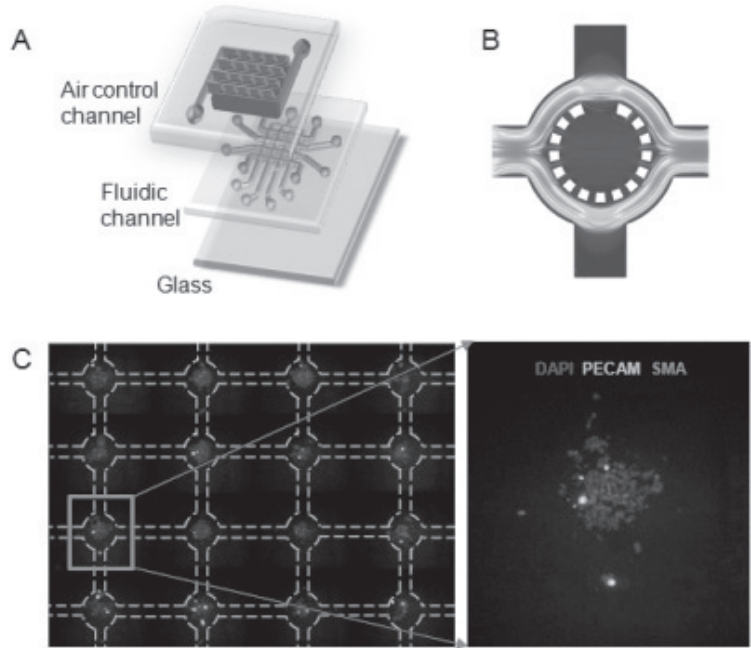


그림 1 마이크로플루이딕칩을 이용한 배아줄기세포에서 혈관내피세포로의 분화 연구: (A) 공기 제어 채널과 마이크로플루이딕 채널로 구성된 마이크로플루이딕칩; (B) 마이크로 챔버 어레이의 Computational Fluid Dynamics 컴퓨터 모델링; (C) 배아줄기세포에서 혈관내피세포로의 분화.(J.M. Lee 등, *Electrophoresis*, 2011, 32(22): 3133-3137)

였고, 이러한 단일 세포 연구결과는 줄기세포 분화 조건을 스크리닝할 수 있을 것으로 기대된다.

최근에 체외(*in vitro*) 모델 연구를 위한 마이크로플루이딕칩 기반의 배아줄기세포 패터닝 기술이 개발되었다(S. Suri 등, *Lab Chip*, 2013, 13: 4617-4624). 3차원적 구성에서 다세포 연구를 위한 기존의 방법은 정확도와 재현성 있는 방법으로 복잡한 환경을 만들기 어렵기 때문에 한계가 있다. 따라서 기존의 패터닝 관련 기술과 비교하였을 때 보다 고속(high-throughput)으로 체외의 다세포 배아체 융합기술을 개발하였다. 마이크로플루이딕칩 내에서 다수의 배아체를 형성하고, 마우스 낭배 형성과 유사한 발생 과정을 모사하였다. 결과적으로, 배아체에 Bone Morphogenic Protein4(BMP4)를 효과적으로 전달하였으며, 6.5일 동안 마우스 배아줄기세포를 중배엽으로 분화를 유도하였고 중배엽 분화 마커

인 Brachyury-T-green Fluorescent Protein(T-GFP)으로 확인하였다. 또한, 마이크로플루이딕칩 내에서 배아줄기세포에서 유도된 혈관 주위세포(pericytes)와 인간 내피세포의 3차원적 공동배양에 관한 기술도 개발되었다(A.D. van der Meer 등, *Lab Chip*, 2013, 13: 3562-3568). 조직을 연구하기 위한 마이크로플루이딕칩은 병리학 및 생리학적 연구를 위한 중요한 플랫폼으로 사용될 수 있으며, 다양한 세포를 공동 배양하여 조직과 같은 미세환경을 만들 수 있다. 혈관은 인체 내에서 모든 조직의 필수적인 부분이기 때문에 혈관구조의 개발은 조직을 모사한 마이크로플루이딕칩 분야에서 중요하다. 따라서, 마이크로플루이딕 채널 안에 콜라겐, 배아줄기세포에서 유도된 혈관 주위 세포와 내피세포 혼합물을 주입하여 마이크로플루이딕 채널 내부에 3차원적인 혈관 조직 구조를 형성하였다. 세포는 채널을 따라 혈관과 같은 하나의 긴 튜브 안에서 조직화 되었고, 공초점 현미경으로 내피 단층의 튜브 형태를 관찰하였으며, 튜브 구조 안에서 세포를 Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1(PECAM-1)으로 염색하였다. 관형성은 Transforming Growth Factor-Beta(TGF- β)에 의해서 파괴되는 것을 확인하였다. TGF- β 의 신호 전달은 일반적인 혈관 형성에 필수적인 요소이다. 설계된 미세혈관에서 TGF- β 의 신호 전달 억제제는 직경이 작고 높은 뒤틀림을 가진 유전성 출혈성 모세혈관확장증과 같은 혈관 질병을 가진 환자에서 발견되는 일반적인 지 않은 혈관 구조를 나타내었다. 또한, 마이크로플루이딕칩을 이용한 유체역학적 흐름 집속(hydrodynamic flow focusing)에 의한 하이드로젤 패터닝 기술이 개발되었다(S. Cosson 등, *Lab Chip*, 2013, 13: 2099-2105). 마이크로플루이딕칩에서 gradient 형성 시스템은 형태형성(morphogen) 단백질이 발생 과정 동안 세포의 운명에 미치는 영향과 같은 체외에서 생분자의 신호에 대한 세포의 거동을 조사하기 위한 정확한 방법을 제공한다. 그러나 기존의 농도구배(gradient) 마커 형성은 비생리학적 플라스틱 또는 유리 기관의 세포 배양을 위

해 디자인 되었다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 polyethylene glycol(PEG) 하이드로젤과 마이크로플루이딕칩을 결합하여 PEG의 표면에 단백질 농도구배를 형성하였다. 또한, Leukemia Inhibitory Factor(LIF) 농도구배가 어떻게 배아줄기세포의 거동에 영향을 미치는지 평가한 결과, 배아줄기세포는 LIF 농도구배에서 다능성 마커를 발현하고, 자가재생 콜로니(colony)를 형성하였다. 이러한 방법은 줄기세포의 운명에 영향을 주는 복잡한 신호의 미세환경을 조사하기 위해 광범위하게 적용될 수 있다. 이와 같은 최근의 연구결과들을 통하여 마이크로플루이딕칩은 줄기세포의 배양과 분화 특성을 연구하기 위한 중요한 도구로 사용될 수 있음을 확인하였다.

마이크로웰을 이용한 줄기세포 연구

마이크로웰 기술은 줄기세포의 3차원적 배양이 가능하므로 실제 인체 조직과 유사한 환경을 제공할 수 있다. 마이크로웰을 이용하여 배아줄기세포에서 혈관내피세포로 분화를 연구하였다(J.E. Kim 등, *Biomedical Microdevices*, 2014, 16: 559-566) (그림 2). 배아줄기세포와 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 상호작용은 배아줄기세포의 분화를 조절할 수 있으며, 배아체의 크기는 세포가 분화되는 것을 결정짓는 중요한 요소 중에 하나이다(Y.S. Hwang 등, *PNAS*, 2009, 106(40): 16978-16983). 배아체(embryoid bodies)를 균일한 크기로 조절하기 위하여 조직공학 연구에서 폭넓게 사용되는 하이드로젤 마이크로웰을 사용하였으며, 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 파이브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin), 매트리지젤(matrigel)과 같은 다양한 조성의 ECM에서 배양하였다. 젤라틴과 비교하였을 때 콜라겐과 라미닌에서 혈관내피세포로 더 많이 분화하는 것을 확인하였으며, 혈관내피세포 유전자인 Flk1이 콜라겐에서 높게 발현된 것을 확인할 수 있었다. 더 나아가서 내피세포의 분화에서 integrin의 효과에 대하여 확

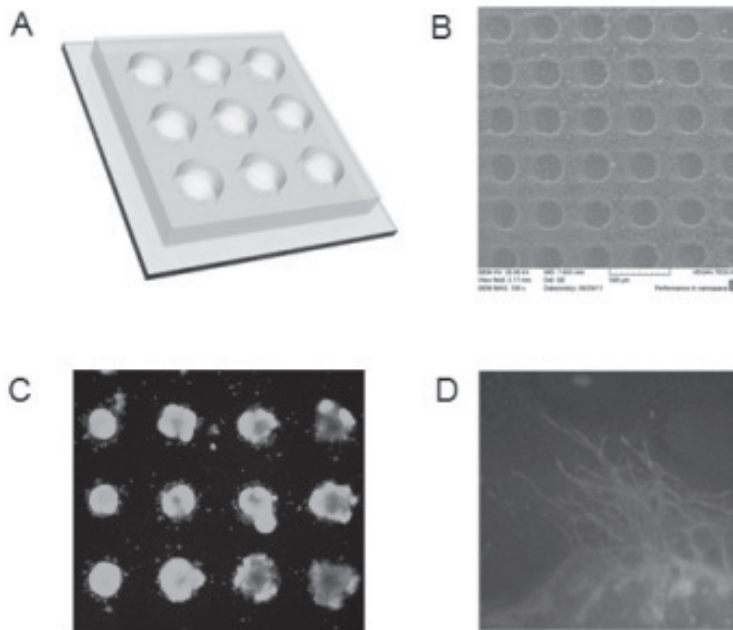


그림 2 마이크로웰을 이용한 배아줄기세포에서 혈관내피세포로의 분화 연구: (A) PEG 하이드로젤 마이크로웰안에서 균일한 크기로 배아체가 형성되는 모습; (B) PEG 마이크로웰의 SEM 사진; (C) PEG 마이크로웰에서 세포의 생존을 보여주는 형광 사진; (D) 라미닌에서 혈관내피세포로 분화된 형광사진(J.E. Kim 등, *Biomedical Microdevices*, 2014, 16: 559-566).

인한 결과, integrin $\alpha 1$ 이 라미닌에서 높게 발현되었다는 것을 확인하였다. 따라서, 줄기세포와 세포외기질의 상호작용은 균일한 크기의 배아체로부터 내피세포의 분화를 유도하는 데에 있어서 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 또한, 알지네이트젤(alginate gel)로부터 마이크로웰을 제조하기 위한 기술이 개발되었다(F. Ozawa 등, *Lab Chip*, 2013, 13: 3128-3135). 알지네이트젤 마이크로웰은 3차원 배양을 위해 사용되었으며 ITO 전극 위에 패터닝을 하였다. 배아줄기세포 또는 간세포 암종세포는 3T3 fibroblast세포를 포함한 알지네이트젤 마이크로웰에서 배양하였다. 배양과정 동안 배아줄기세포와 간세포 암종세포는 성공적으로 스페로이드를 형성하였고, 간세포 암종세포의 간 특성 유전자 발현은 3T3 fibroblast세포와 함께 마이크로웰안에서 3차원 공동배양을 하는 동안 증가하는 것을 확인하였다. 최근에는 간단한 방법으로 친수성 실리콘 마스터를 이용하여

줄기세포를 응집할 수 있는 아가로오스(agarose) 마이크로웰 표면 패터닝 기술이 개발되었다(J. Dahlmann 등, *Biomaterials*, 2013, 34: 2463-2471). 비접착 아가로오스 마이크로웰은 유도만능 줄기세포와 인간 배아줄기세포의 응집을 위해 사용되었다. 유도만능 줄기세포가 아가로오스 마이크로웰 안에서 균일한 모양으로 더 빨리 배아체를 형성하였으며, 수확 효율 및 배아체의 크기 분포가 일반적으로 사용하는 행잉드롭(hanging drop)과 유사한 결과를 보여주었다. 또한, 인간 배아줄기세포에서 심근세포로의 분화를 성공적으로 유도하였다.

마이크로플루이딕칩과 마이크로웰 기술을 이용한 줄기세포 연구

마이크로플루이딕칩이 가진 장점과 마이크로웰이 가진 장점을 동시에 이용하여 줄기세포를 연구하였다. 당뇨병을 치료하기 위해서 이자세포를 이식하여 인슐린 분비를 유도하는 연구가 보고되었다(Y. Jun 등, *Biomaterials*, 2014, 35(17): 4815-4826). 간세포와 이자세포는 상호작용을 통해 간세포를 더 오래 생존하도록 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 상호작용을 통해 이자세포의 이식량을 줄여도 혈당 조절능력이 유지되는지 알아보기 위해서 마이크로웰에 이자세포와 간세포를 주입하여 공동 배양된 구체를 만들고, 마이크로플루이딕칩을 이용하여 공동배양 구체를 캡슐화한 마이크로파이버를 형성하였다. 마이크로파이버를 당뇨쥐에 이식하여 포도당 내성검사를 수행한 결과 정상 쥐와 유사한 혈당 변화를 관찰하였으며, 마이크로 파이버에 넣은 공동배양 구체를 면역 형광 분석법으로 확인한 결과 인슐린이 검출되었다. 이러한 마이크로플루이딕칩과 마이크로웰을 동시에 사용한 연구 결과는 당뇨병 치료에 많은 도움이 될 것으로 기대되어

진다. 또한, 3차원의 저산소 환경에서 인간 신경 줄기세포 분화의 정량 분석을 위한 마이크로플루이딕 어레이 칩이 개발되었다(K. Yang 등, *Biomaterials*, 2013, 34(28): 6607-6614). *In vivo* 환경에서 인간 신경 줄기세포 연구를 위하여 인체와 유사한 저산소 환경과 3차원 구조를 만들었다. Real-time polymerase chain reaction과 자가재생 능력과 분화 효과를 정량분석하기 위해 마이크로플루이딕 어레이칩을 기관에서 떼어낼 수 있도록 제작하였으며, 개발된 마이크로플루이딕 어레이칩

을 이용하여 3차원 저산소 환경에서 인간 신경 줄기세포가 분화를 하는 동안 신경 세포의 자가재생 능력을 유지하는 것을 확인하였다. 그리하여, 이 글에서는 마이크로플루이딕칩과 마이크로웰 기술들을 이용한 줄기세포의 성장과 분화연구의 최신 연구동향에 대해 살펴 보았다. 앞으로, 이러한 마이크로 기술들은 다양한 줄기세포 기반의 조직재생 연구 분야와 동물실험을 대체 할 수 있는 연구분야에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.



기계용어해설

구획화재(Compartment Fire)

벽과 출입구 등으로 구획이 나누어진 공간에서의 화재.

기체상 복사(Gas-Phase Radiation)

복사 열전달에 관여하는 기체에 의한 열복사 현상.

기체상 복사(Gas-Phase Radiation)

열복사에 관여하는 기체에 의한 열복사 현상.

나노윤활유(Nano Lubrication Oil)

순수윤활유에 나노입자를 첨가하여 윤활특성과 열전달 성능을 향상시킨 윤활유로서 Graphite(흑연), CNT(탄소 나노튜브) 등이 가능성 있는 입자로 시험되고 있음.

나선형 와이어 덩어리 카고메(Wire-woven Bulk Kagome)

나선형 와이어를 3차원공간에서 6축 방향으로 조립하여 카고메 트러스와 유사한 구조를 갖는 규칙적인 다공질 금속.

난류 경계층(Turbulent Boundary Layer)

평판 위에 흐르는 난류유동에 의해 생성된 경계층

난류 유동(Turbulence Flow)

3차원 비정상 불규칙 유동을 말하며, 보통 레이놀즈수가 증가하면 유동의 불안정성이 증가하면서 난류유동이 됨.

누센수(Knudsen Number)

기체의 희박정도를 나타내는 무차원수로서 유동의 특성 길이에 대한 분자 평균자유경로의 비(Ratio)를 의미함.

대기경계층(ABL : Atmospheric Boundary Layer)

지면을 둘러싸고 있는 대기층에서 지면(Planetary Surface)의 영향을 직접적으로 받는 부분을 말함. 대기경계층 내부에서는 난류(Turbulence)의 영향으로 인해 열, 수증기, 오염물질, 이산화탄소 등의 이동과 확산이 활발하게 일어남.

드래그펌프(Drag Pump)

로터의 고속회전에 의해 기체분자를 배기시키는 분자펌프의 일종.

디지털 입자 홀로그래피(Digital Particle Holography)

입자의 홀로그램을 CCD 카메라에 기록, 컴퓨터로 입자 이미지를 재생하는 기법

디지털 입자화상속도계(Digital Particle Image Velocimetry)

입자화상을 이용한 속도측정 기법

마이크로 핀관(Micro-fin Tube)

현재 냉동기 및 에어컨 시스템의 열교환기에 열전달 촉진관의 하나로서, 주로 동으로 제작되어 관의 내부에 나선형 홈이 위치하고 있고, 0.1-0.25mm 정도의 핀이 있는 관.