

MEA 기반 신경제약 스크리닝 기술 개발 동향

Trends in MEA-based Neuropharmacological Drug Screening

김용희 (Y.H. Kim, josephinkim@etri.re.kr) 사이버브레인연구실 책임연구원

정상돈 (S.-D. Jung, jungpol@etri.re.kr) 사이버브레인연구실 책임연구원

ABSTRACT

The announcement of the US Environmental Protection Agency that it will stop conducting or funding experimental studies on mammals by 2035 should prioritize ongoing efforts to develop and use alternative toxicity screening methods to animal testing. Toxicity screening is likely to be further developed considering the combination of human-induced pluripotent-stem-cell-derived organ-on-a-chip and multielectrode array (MEA) technologies. We briefly review the current status of MEA technology and MEA-based neuropharmacological drug screening using various cellular model systems. Highlighting the coronavirus disease pandemic, we shortly comment on the importance of early prediction of toxicity by applying artificial intelligence to the development of rapid screening methods.

KEYWORDS human-induced pluripotent stem cell, multielectrode array, organ-on-a-chip system, toxicity screening

1. 서론

신경제약 개발과정은 통상적인 신약 개발 파이프라인에 따라 약물 설계, 효능 검증, 초기 약성 평가를 포함하는 후보물질 탐색 및 발굴 단계, 독성과 신약의 유효성을 동물 또는 세포 등을 대상으로 실험하는 비임상 단계, 독성과 효능이 평가된 물질을 환자 대상으로 검증하는 임상 단계 그리고 규격화, 생산 및 시판 후 임상을 진행하는 상용화 단계에 따라 진행하고 있다. 현재 신경제약 독성평가 접근 방식

은 동물의 행동분석, 신경 생리학, 병리학 및 구조적 결과를 분석하면서 전체 동물모델의 선량 효과 특성화에 의존하고 있으며, 신경독성 물질 '작용 방식' 연구는 많은 화학물질에 공통적인 독성경로의 식별보다는 개별 화학물질의 세포, 분자 및 하위 분자들에 대한 작용에 관한 정보 수집에 집중되고 있다. 하지만 이와 같은 독성 특성화로 설계된 접근법은 많은 수의 화학물질을 신속하게 테스트할 수 없으므로 독성의 특성화보다는 예측에 초점을 맞춘 독성시험에 적합하지 않다. 또한, 이와 같은 접근법

* DOI: <https://doi.org/10.22648/ETRI.2023.J.380106>

* 본 연구는 한국전자통신연구원 연구운영비지원사업의 일환으로 수행되었음[22ZB1160, ICT 창의기술 개발].



으로는 발작, 신경독성 반응과 같은 중추신경계 영향을 체외 독성 평가에서 감지하기 어렵다. 예를 들어, 다양한 살충제에 의해 AA(Amino Acid) 수용체는 세포 수준에서 흥분성을 증가시키고 신경 발화 억제된 네트워크 활동을 증가시키는데, 이와 같은 현상은 단백질이나 계층 반응의 개입을 필요로 하지 않는다. 반면에 신경네트워크 활성 변화를 측정하는 전기 생리학적 접근법은 신경네트워크의 활성 변화로 나타나는 신경독성 여부를 판단하는 데 이상적인 방법이다. 신경계에서 생리학적 최종 산출물의 중요성을 고려할 때, 신경독성을 예측할 수 있는 시험 접근법 개발이 가장 중요하다.

근래 신경독성 판별을 목적으로 신경 발달과정에 대한 화학적 영향을 평가하기 위한 고품량 선별(HCS) 그리고/또는 높은 처리량 선별(HTS) 방법을 개발하는 데 초점이 맞춰지고 있으며[1], 실제로 현재 유전자 발현[2], 신경 전구세포 증식 및 분화[3], 신경돌기 확장[4], 시냅스 생성 및 교세포 기능을 포함하는 신경 발달과정에 대한 분석법이 개발되고 있다. 이러한 HCS 및 HTS 접근법은 고정 조직이나 조직 균질체를 이용하는 경우가 많으며, 살아있는 뉴런의 생리학적 기능을 평가하지 않기 때문에 화학물질의 효과가 일부 결핍되어 신경계 기능과 관련된 독성경로의 판별이 어려워질 수 있다. 따라서 이와 같은 접근법을 보완하기 위해서는 신경 활성의 전기 생리학적 측정이 이루어져야 한다. 전기

생리학에서 신경 활성 측정에는 세포내(Intracellular)와 세포외(Extracellular) 측정법이 있다. 세포내 측정에는 주로 패치 클램프 기록법(그림 1(a))이 사용되는데, 이 방법은 마이크로피펫 구조의 전극을 세포 내로 관통하여 활동전위를 측정함으로써 화학물질이 뉴런의 전기적 흥분을 제어하는 막 결합 이온 채널 및 막 재흡수 트랜스포터와 어떻게 상호작용하는지 등에 대한 많은 정보를 제공한다. 활동전위는 수십 mV 수준 그리고 전류는 pA 수준까지 측정 가능하여 단일 이온채널에 대한 연구가 가능하다. 근래 자동화 및 멀티 패치 기술이 구현되었지만 세포 손상에 의한 측정 기간의 제한, 세포 취급의 어려움, 그리고 부족한 재현성 등의 한계가 있다[5]. 이러한 한계를 극복할 수 있는 접근법으로 MEA(Multi-Electrode Array)를 사용한 세포외 신경신호 측정법이 있다(그림 1(b)). 이 방법은 세포내 측정법에 비해 신호 세기는 상대적으로 낮지만, 비침습적으로 세포의 물리적 손상 없이 장기간 기록이 가능하며, 여러 신경세포의 활동을 동시에 측정하여 네트워크 수준의 발화특성을 살펴보는 동시에 세포수준의 신호 및 공간 해상도를 가지고 있어서 독성 스크리닝에 유리하다. MEA는 그림 1(c)와 같이 절연 표면에 내장된 생체적합성 전극의 2차원 그리드로, 각 전극은 근접한 전극과 전기적으로 독립적이며 전압 또는 전류를 측정하는 증폭기에 연결되기 때문에 MEA를 이용하면 2차원 평면에서 전압 또는 전류 신호

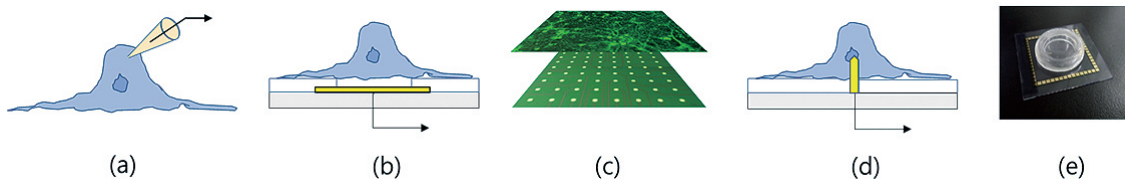


그림 1 (a) 패치 클램프 세포내 측정법, (b) 평면 전극 기반 세포외 측정법, (c) 초대배양 신경네트워크가 형성된 MEA, (d) 마이크로/나노 탐침 구조 3-D 신경전극, (e) 단일 웰 MEA 모습

분포를 측정할 수 있다. 또한, 고밀도 MEA는 동시에 여러 세포의 신호를 측정하기 때문에 어레이의 밀도와 기능 및 세포 밀도에 따라 배양 또는 슬라이스 내의 많은 세포에서 동시에 신호 측정이 가능하다. 또한, MEA는 세포를 파괴하지 않고 세포의 전기적 활성을 측정하기 때문에 장기간 신호 측정이 가능하여 중추신경계 기능에 대한 제약 및 환경 화학적 영향 평가를 위한 비침습적 플랫폼으로 적당하다.

본고는 MEA를 이용한 세포의 신경 신호 측정 방법에 대한 소개와 HTS를 위한 MEA 플랫폼 개발 동향을 설명하고, MEA를 사용하는 현재 약물 선별 접근법과 다양한 종류의 제약 화합물을 특성화하고 구별하는 능력에 대한 개요를 제시한다. 또한, 실험 동물의 초대배양 신경세포 및 휴먼 유래 만능 줄기 세포로부터 분화된 신경세포를 이용한 약물 스크리닝, 3차원 조직을 모사한 organ-on-a-chip, 그리고 이들과 MEA가 결합된 측정 플랫폼을 이용한 약물 스크리닝에 대한 개요를 포함하고 있다.

II. MEA 기술 개발 동향

MEA는 신경 신호를 기록하거나 신경에 신호를 제공하는 기능을 가지는 다수의 마이크로 전극이 배열된 소자로 정의되는데, 통상적으로 생체에 삽입되는 MEA는 *in vivo* MEA와 삽입되지 않는 MEA는 *in vitro* MEA로 분류된다. 1972년 MEA에 배양된 신경세포로부터 신경신호 측정 최초 보고[6]와 1998년 최초의 상용 MEA 개발 보고[7] 후 MEA는 현재 신경 회로망 제작, 질병 모델 제작, 휴먼 유래 만능줄기세포 분화 검증, 제약 스크리닝, 신경망 동특성 연구, 그리고 신경망 학습 연구 등에 사용되고 있다. MEA에 적용 가능한 생물학적 시스템은 초대배양 신경세포, 휴먼 유래 만능 줄기세포, 초대 배

양, 심장세포, 그리고 다양한 부위의 뇌 절편(Slice) 등이 있으며, 통상적으로 스파이크(Spike) 신호가 기록된다. 뇌 절편의 경우 스파이크뿐만 아니라 지역 장전위(Local Field Potential)도 기록된다.

구조 측면에서 MEA는 그림 1(b)와 같은 마이크로 전극들이 평면상에 배열된 평면형 MEA, 그리고 그림 1(d)와 같이 평면에서 수직 방향으로 돌출된 3-D MEA로 구분된다. 3-D MEA는 구조적으로 물리적 접착력이 뛰어나 신경 절편이나 organoid에 적합하다. 특히 전극 지름이 수 μm 이하인 3-D 전극은 세포가 전극을 완전하게 감싸는 구조를 구현하여 높은 신호 레벨을 제공하는 반면에 전극 크기가 작아서 기록 확률이 낮은 단점이 있다. 전극 구동 방식에 있어서 MEA는 순전히 전극만 존재하는 수동 MEA, 그리고 신호 증폭 및 아날로그-디지털 전환회로가 전극에 위치하는 능동 MEA로 구분된다. 수동 MEA의 경우 연결 가능한 전극의 수가 연결 패드 수(N)와 동일하며, 능동 MEA의 경우 연결 가능한 전극의 수가 $(N/2)^2$ 으로 패드 수 대비 연결 가능한 전극의 수가 현저하게 큰 장점이 있다. 능동 MEA는 CMOS MEA로도 불리는데, 현재 수만 채널의 CMOS MEA가 시장에 나와 있으며, 독성 스크리닝보다는 신경 신호의 전파 특성 등 기초연구에 적합하다. MEA는 그림 1(e)와 같이 세포 배양액을 가둬두는 웰(Well)을 포함하는데, 웰이 하나일 때 단일 웰 MEA 그리고 여러 개 존재할 때 멀티 웰(Multi Well) MEA로 구분된다. 그림 1(b)와 같이 표현되는 MEA의 엄밀한 분류 명칭은 *in vitro* 평면형 수동 단일 웰 MEA가 되며, 간단하게 MEA로 표기된다.

그림 1(b)와 같이 표현된 표면이 신경세포와 접하고 있는 전극은 신경전극으로도 정의되는데, 신경전극의 성능은 기록성능과 자극 성능으로 나누어진다. 신경 신호 기록 시 신경 신호뿐만 아니라 잡음도 기록되는데, 측정시스템 잡음을 제외하면 잡

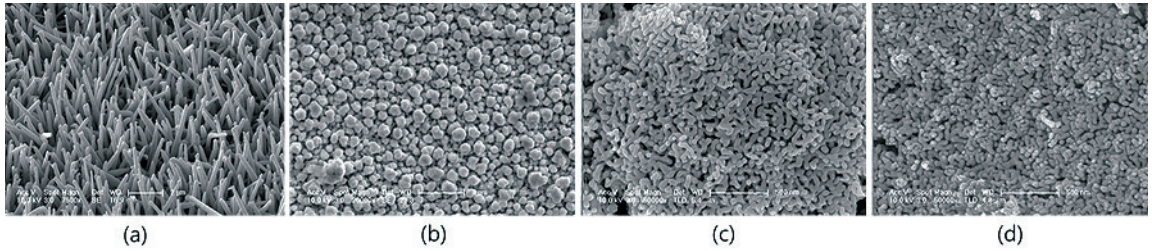


그림 2 (a) ITO 산화물 나노 선, (b) 금-백금 나노입자, (c) 나노다공성금 구조체, (d) 이리듐산화물 전착된 나노 다공성금 구조체로 표면 개질된 신경 전극 예시

음은 신경전극에서 떨어져 있는 주변 신경 세포들의 신호와 그리고 열잡음(Thermal Noise)으로 구성된다. 이 가운데 열잡음은 신경전극과 신경 조직 간 계면의 임피던스(Impedance)의 제곱근에 비례한다. 임피던스는 표면적의 제곱에 반비례하기 때문에 신경전극의 표면적을 증가시킴으로써 열잡음을 줄이는 것이 가능하다. 감소한 열잡음은 신호대비 잡음비(SNR: Signal-to-Noise Ratio)를 향상한다. 통상적으로 전극의 표면적을 증가하는 데에는 전도성 소재로 구성된 나노 입자, 나노 선, 나노 막대, 나노 튜브, 나노 필라멘트, 그리고 나노 다공성 구조 등 부피 대비 표면적이 고유하게 큰 특성을 가지는 나노 구조체가 적용되고 있으며, 전도성 소재로는 금속, 전도성 고분자, 탄소, 금속산화물 및 금속 질화물 등 다양한 재료가 적용되고 있다[8-13]. 그림 2는 ITO 산화물 나노선, 금-백금 나노입자, 나노다공성 금 나노구조체, 이리듐산화물 나노입자가 전착된 금 나노구조체를 이용한 신경 전극 표면개질의 예시를 나타낸다. 그리고 통상 SNR > 5이면 스파이크 분류 등이 가능하다. 수년 이상 장기간 뇌에 이식되기 때문에 완벽한 생체적합성과 신뢰성 그리고 궁극적으로 FDA 승인이 요구되는 신경 탐침(Neural Probe)에 비하여, in vitro MEA는 FDA 승인이 필요하지 않으며 비독성이면 충분한 소재 선택 측면에서 여유가 있다. MEA를 통해 통상적으로 측정되는 발화신

호 세기는 약 0.2 mV 내외로 전극과 신경세포 간 거리(r)에 영향을 받는데, $1/r^2$ 에 비례하여 거리 약 20 μm 이내일 때 안정적인 기록이 가능하다[14]. 유효 기록 전극 수 효율은 MEA에 포함된 전체 전극 수 가운데 실제 기록 전극 수를 나타내는데, 이 값이 클수록 적은 수의 전극으로도 원하는 특성을 얻을 수 있으며, 특히 멀티 웰 MEA 제작과 이를 이용한 제약 스크리닝 시스템 구축에 유리하다.

신경전극의 전기자극 성능은 신경조절 모사 자극 프로토콜 추출, 신경가소성 연구, 그리고 양방향 인터페이스 연구에 있어서 매우 중요하다. 전기자극 성능은 전하주입한계(CIL: Charge Injection Limit)로 평가되는데, 특정 크기와 기하학적 구조를 가진 용액의 전극에 대해 가역 CIL은 비가역적인 화학 반응을 일으키지 않고 전극에서 주변으로 이동할 수 있는 전하의 양으로 정의된다. 이 값이 클수록 물창(Water Window) 범위에서 작은 분극으로 다량의 전하를 주입 즉, 전기자극을 안전하게 하는 것이 가능하다. CIL은 임피던스가 낮을수록 증가하여 전극의 표면적을 증가시켜 그 값을 증가시키는 것이 가능하다.

III. 동물 신경세포 이용 독성 스크리닝

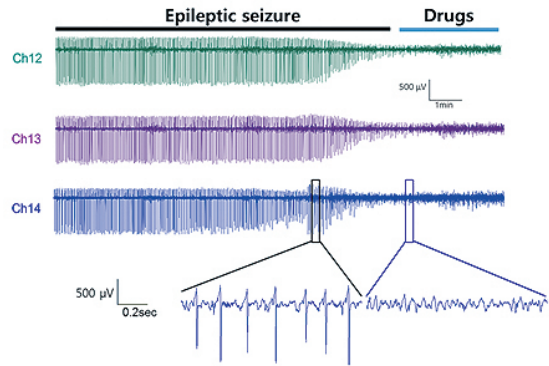
MEA를 이용한 약물 스크리닝에는 설치류 태아

뇌로부터 적출된 초대배양 뉴런 모델, 성체 설치류 뇌로부터 마련된 절편 모델, 그리고 설치류 심장 세포 모델이 주로 적용되었으며, 그 가운데 초대배양 뉴런 모델과 절편 모델들은 ‘gold standard’로 가장 널리 활용되고 있다. 초대배양을 통해 체외 성장된 뉴런은 체내 성장과 기본적인 과정을 유지하기 때문에 체외 성장 뉴런의 전기 생리학적 활성을 다양한 접근법으로 측정하고 평가하여 신경활동 또는 신경독성에 영향을 미치는 물질을 스크리닝하기 위한 목적으로 사용될 수 있다. 또한, 배양 초기의 신경 활동은 무작위한 분포를 보이지만 성장 과정 중 상호작용에 의한 연결은 여타 다른 신경네트워크와 유사하여 전 임상 신경활동 및 신경독성 스크리닝을 위한 지표로 사용 가능하다. 동물 신경세포를 이용한 약물 스크리닝 예시는 다음과 같다.

1. 발작

약물 이상 반응의 대표적인 사례 가운데 하나인 발작(Seizure)은 뇌전증(Epilepsy)의 징후로 비정상적이고 과도적으로 발생하는 순간적인 뉴런의 과흥분(Hyperexcitability) 상태와 과동기(Hypersynchrony)로 특징되는데, 신약 개발과정에서 가장 통상적으로 마주치는 CNS 관련 이슈이다. 현재 발작 시험은 주로 *in vivo* 전 임상 단계에서 시행되고 있는데, *in vivo* 시험의 단점은 다수의 동물을 사용하는 데에 있으며, 전문 실무자가 요구되고 비용이 많이 들며 처리율이 높지 않다[15].

또한, *in vitro* 평가에서도 쥐 해마절편을 이용한 스크리닝은 해마절편의 보존 시간이 짧기 때문에 시편 준비와 테스트가 반드시 당일에 진행되어 처리량이 낮은 단점을 가지고 있다[16]. 반면에 초대배양 대뇌피질 뉴런을 이용한 발작 스크리닝은 시간별 발화 특성 변화 측정이 가능하며, 약물의 농도



출처 Reproduced with permission from [13].

그림 3 쥐의 배양된 피라미드 뉴런에서 지속적 반복 발화에 대한 항발작약물(Anti-seizure Drug) 효과 예시

에 따른 효능 또는 부작용 검증이 가능한 장점이 있다. 간질 발작 약물 투여에 의해 지속적으로 간질에 의한 반복 발화를 일으키는 배양된 신경세포에 항발작 약물을 투여하며 반복발화 현상이 사라지는 것이 여러 연구에서 보고되었다[17]. 그림 3은 발작 상태에서 약물을 투여했을 때 발작 완화에 효과가 있음을 나타내는 약물 효과의 예시이다.

MEA에 초대배양 대뇌피질 뉴런을 이용하여 투약된 다양한 약물에 따른 발작 관련 체계적인 발화특성 변화 측정이 진행되었다[18]. 신경 생리학적 문제를 야기하는 화합물을 식별하기 위하여 멀티 웰 MEA에 쥐 대뇌피질 뉴런을 성장하였으며 화합물 투약 후 12개의 전기생리학적 반응패턴(Spike Train Descriptor)의 시간에 따른 변화를 관찰하였다. 반응패턴은 음성 대조군, 비히클 대조군 및 신경독성 대조군과 관련하여 매핑하였으며 GABA_A 길항제, 글리신 수용체 길항제, 이온 채널 차단제, 무스카린작용제, δ-오피노이드 수용체 작용제, 도파민성 D2/아드레날린성 수용체 차단제 및 비스테로이드성 항염증제를 포함하여 다양한 치료 적응증 및 표적이 있는 20가지 화학물질에 대한 테스트를 진행하였다. 17개의 발작성 신경독성 화합물 중 16개

는 발작 야기 또는 신경독성에 대해 양성으로 테스트되었으며, 또한 발화율(Firing Rate)과 버스트(Burst) 특성 등 발작 반응과 관련지을 수 있는 반응패턴이 관찰된 반면, 음성 및 대조군 화합물은 신경 활성화에 별다른 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 MEA 초대 배양 뉴런을 이용한 in vitro 약물 스크리닝 방법이 유효함을 뒷받침한다.

2. 알츠하이머

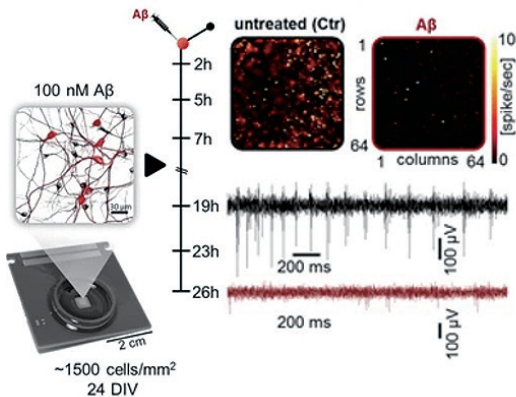
가장 흔한 신경 퇴행성 질환인 알츠하이머병(AD: Alzheimer's Disease)은 해마와 측두엽피질을 포함한 특정 대뇌피질 영역에서 뉴런의 손실이 발생한 후 그다음에 인지장애가 발생하는 것이 특징이다. '정상' 노화 및 AD 관련된 모든 연결점(Plaques)에 다양한 Aβ(Amyloid-beta)가 존재하고, 세포외 아밀로이드 베타1-42(Aβ) 펩타이드의 독성 가용성 올리고머 축적은 AD4-6의 발생에 중심적인 인과적 역할을 하며, 다른 신경퇴행성질환과 마찬가지로 AD의 일반적인 특징인 신경네트워크 활동의 흐트러짐과 관련이 있음이 보고되어 있다[19]. 신경조직의 전기적 특성을 고려할 때 전기적 기능의 상실은 뉴런의 손

상을 나타내며, 신경 퇴행성 질환의 전형적인 증상의 시작점으로 간주되어 Aβ가 전체 신경망에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MEA를 활용한 연구가 꾸준히 진행되고 있다[20-22].

일반적인 MEA의 낮은 공간 분해능을 극복하고 대규모 신경 활동 기록을 활용하기 위하여 4,096개의 전극을 포함하는 CMOS MEA를 활용하여 세포 수준에서 네트워크 활동 변화를 모니터링하고 Aβ-신경독성에 의해 유도되는 초기 활동 변화가 측정되어 보고되었다(그림 4)[23]. 신경병변 발병 초기에 이전에 보고된 병변 생리학적 조건인 나노몰(Nano Mole) 수준의 Aβ-올리고머에 의한 네트워크 활성 변화를 모니터링하였으며, 이 in vitro AD 모델이 이전에 보고된NMDA 의존성 흥분 독성과 Aβ 독성을 연관시키고 세포 사멸 이전의 초기 독성 조건에서 변화를 판별할 수 있음을 확인하였다. 이 보고에서 체외 모델을 통해 Aβ 독성에 의해 유도된 네트워크 활동 규제 완화를 반영하는 NMDA 농도를 식별할 수 있음을 확인하였으며, 이는 네트워크 수준에서 시냅스 외 NMDA 수용체 활성화의 중요한 역할을 확인하였다.

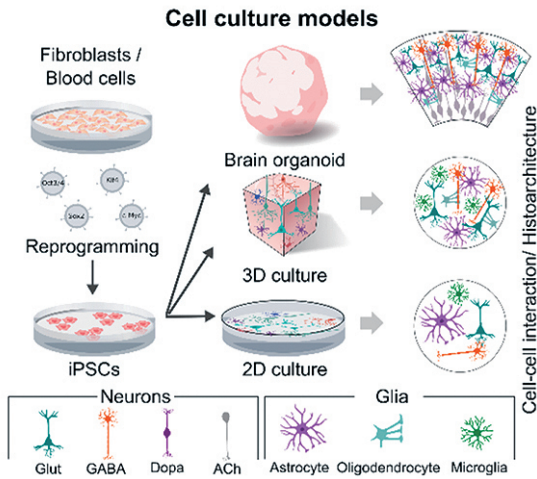
N. 휴먼 유래 만능 줄기세포를 이용한 약물 스크리닝

동물 모델들을 사용한 약물 스크리닝 결과가 실제 적용 단계에서 실패하는 가장 큰 이유로 동물모델이 휴먼 생리를 완벽하게 모방할 수 없는 점이 대두되고 있으며, 이에 따라 휴먼 유래 만능 줄기세포(hiPSC)로 유도된 뉴런 이용이 증가 추세에 있다. 실제로 2010년대 초반부터 hiPSC 뉴런 모델이 MEA에 적용되고 있다. hiPSC 뉴런 모델은 설치류와 휴먼 간 공백을 메울 수 있는 장점으로 그리고 동물 실험 대체 측면에서 적용이 증대되고 있다. hiPSC



출처 Reproduced with permission from [23], CC BY 4.0.

그림 4 0.1 μM Aβ-올리고머 처리 후 자발적 신경 발화 변화



출처 Reproduced with permission from [24], CC BY 4.0.

그림 5 휴먼 유래 줄기세포로부터 분화된 세포 모델

뉴런 모델의 MEA 적용은 줄기세포로부터 뉴런 세포로 분화된 hiPSC 뉴런 모델을 MEA에 적용하여 화학물질의 독성 판별에도 활용되고 있다[24] (그림 5).

최근 hiPSC 신경세포를 MEA에서 배양하여 약물 수용체 연구가 수행되었다[25]. 체외 배양된 hiPSC 신경세포로부터 기록된 스파이크는 나트륨 채널 차단제인 tetrodotoxin에 의해 억제하는 것을 측정하였으며, 이러한 데이터는 표준 배양 조건에서 hiPSC로부터 유도된 뉴런이 약물 스크리닝에 적용될 수 있음을 확인한다.

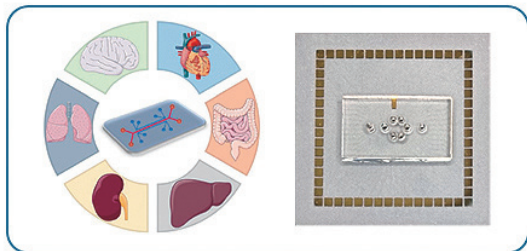
기록과 자극이 가능한 CMOS-MEA에 휴먼 유래 줄기세포와 쥐의 심근세포를 배양하여 이온 채널 차단 특성을 갖는 약물인 퀴니딘과 베라파밀의 효과에 대한 측정결과가 보고되었다[26]. 이 실험에서 이온채널 차단 약물을 특징할 수 있을 정도의 안정적인 신호를 장기간 기록함으로써 MEA를 이용한 약물 스크리닝이 가능함을 보여 주었다. 또한, hiPSC 심근세포를 MEA에 배양하여 약물이 심장에 미치는 영향을 스크리닝할 수 있음을 보고되었다[27]. 이 보

고에서 MEA 기록 결과로부터 항정신성 약물 복용 환자에서 나타나는 빈맥이 심근세포 기능에 직접적인 영향을 줄 수 있음을 알아내었으며, 이들 결과로부터 MEA와 hiPSC 심근세포를 기반으로 하는 신호 측정은 스크리닝 도구로 적용 가능성이 보고되었다.

V. Organ-on-a-chip과 MEA 집적 시스템을 이용한 약물 스크리닝

신경제약 스크리닝에는 주로 뇌 절편과 동물 초대배양 신경세포, 휴먼 유래 신경세포들이 주로 사용되고 있으며, 이들을 이용한 제약 스크리닝에서도 많은 성과가 나타나고 있다. 하지만 이들은 모두 2D 구조 또는 제한된 2D 구조를 가지고 있어서 실제 3D 구조를 가지는 뇌에 비하여 기능적 차이가 크며, 세포가 성장하는 과정에 필요한 주변 환경을 포함하고 있지 않기 때문에 생체와 유사한 환경을 제공하기에는 부족함이 있다.

최근에는 3차원 공배양 기술과 혈류모사 미세유체 역학 기술을 융합하여 조직 또는 장기의 세포 간 상호작용 및 미세환경을 구현한 생체 조직 칩을 제작하고 MEA와 결합하여 약물 스크리닝에 활용하는 연구가 새롭게 진행되고 있다(그림 6)[28]. 가장 최근 Molina-Martínez 등[29]은 MEA가 결합된 미



출처 Reproduced with permission from [28], CC BY 4.0.

그림 6 마이크로 플루이딕채널 기반 organ-on-a-chip과 MEA가 결합 된 실시 예

세유체 채널 칩에 뉴런을 3차원으로 배양하여 약물테스트, 광 자극, 칼슘 이미지 등을 시행하였다. 이 연구에서 Picrotoxin과 같은 발작 유발 테스트를 진행하여 유효한 신경신호를 측정하여 생체조직 칩-MEA 결합을 통한 신경계 질환 연구 및 약물 스크리닝 가능성이 확인되었다.

VI. 향후 전망

인류가 제조하는 화학물질의 수는 급속하게 증가하고 있는 반면에 제한적인 화학물질에 대해서만 전통적인 방법을 통해 독성 평가가 이루어지고 있다. 그리고 최근 유행성 감염으로 인해 신속한 치료제의 개발이 요구되고 있으나 신속한 독성 평가는 이에 부응하지 못하고 있다. 2019년 미국 환경보호국 EPA는 2035년 동물실험의 원칙적인 금지를 선언하였으며[30], 이를 실행에 옮기기 위해 대체 독성 평가 방법 개발에 대한 예산 지원을 하고 있다.

위와 같은 제한들과 동물 시험을 통과한 약물의 94%가 임상 시험에서 탈락하고 있는 것을 고려할 때 동물 세포 대신에 hiPSC 유도 기술을 기반으로 하는 3D organ 또는 모사 칩 제작 기술에 대한 연구 개발 투자집중이 예상되며, 더불어 이를 지원하고 구현 및 검증하는 역할을 하는 미세유량 칩과 MEA의 집적화 기술의 고도화가 예상된다. 그리고 신속한 독성 판정을 위해 hiPSC 유도 신경세포·조직 배양 초기 약물 투여 후 조기에 예측하는 인공지능 활용 기술[31]의 발전도 전망된다.

약어 정리

CIL	Charge Injection Limit
CMOS	Complementary Metal-Oxide Semiconductor
CNS	Central Nervous System

EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food & Drug Administration
HCS	High-Content Screening
hiPSC	human-induced Pluripotent Stem Cell
HTS	High-Throughput Screening
ITO	Indium-tin oxide
MEA	Multi-Electrode Array
NMDA	N-methyl-D-aspartate receptor
SNR	Signal-to-Noise Ratio

참고문헌

- [1] L.G. Costa et al., "Neurotoxicity of pesticides: A brief review," *Front. Biosci.*, vol. 13, 2008, pp. 1240-1249.
- [2] E.J. Hill, "Differentiating human NT2/D1 neurospheres as a versatile in vitro 3D model system for developmental neurotoxicity testing," *Toxicology*, vol. 249, 2008, pp. 243-250.
- [3] J.M. Breier et al., "Development of a high throughput screening assay for chemical effects on proliferation and viability of immortalized human neural progenitor cells," *Toxicol. Sci.*, vol. 105, 2008, pp. 119-133.
- [4] N.M. Radio and W.R. Mundy, "Developmental neurotoxicity testing in vitro: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth," *Neurotoxicology*, vol. 29, 2008, pp. 361-376.
- [5] J. Gao et al., "Application of electrophysiological technique in toxicological study: From manual to automated patch-clamp recording," *Trends Anal. Chem.*, vol. 133, 2020, article no. 116082.
- [6] C.A. Thomas et al., "A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 74, 1972, pp. 61-66.
- [7] U. Egert et al., "A noble organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode array," *Brain Res. Protoc.*, vol. 2, 1998, pp. 229-242.
- [8] S.M. Wellman, et al., "A materials roadmap to functional neural interface design," *Adv. Func. Mater.*, vol. 28, 2018, article no. 1701269.
- [9] S.F. Cogan, "Neural stimulation and recording electrodes," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 10, 2008, pp. 275-309.
- [10] Y.H. Kim et al., "Iridium oxide on indium-tin oxide nanowires: An all metal oxide heterostructured multi-electrode array for neuronal interfacing," *Sens. Act. B*,

- vol. 273, 2018, pp. 718–725.
- [11] Y.H. Kim et al., "Electrochemical and in vitro neuronal recording characteristics of multi-electrode arrays surface-modified with electro-co-deposited gold-platinum nanoparticles," *Biomed. Microdevices*, vol. 18, 2016.
- [12] Y.H. Kim et al., "In vitro extracellular recording and stimulation performance of nanoporous gold-modified multi-electrode arrays," *J. Neural Eng.*, vol. 12, 2015, article no. 066029.
- [13] Y.H. Kim et al., "Fluoropolymer-based flexible neural prosthetic electrodes for reliable neural interfacing," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, 2017, article no. 43420.
- [14] A.D. Marblestone et al., "Physical principles for scalable neural recording," *Front. Comput. Neurosci.*, vol. 7, 2013, article no. 137.
- [15] A.I. Grainger et al., "In vitro models for seizure-liability testing using induced pluripotent stem cells," *Front. Neurosci.*, vol. 12, 2018, article no. 590.
- [16] N. Matsuda et al., "Raster plots machine learning to predict the seizure liability of drugs and identify drugs," *Sci. Rep.*, vol. 22, 2022, article no. 2281.
- [17] M.A. Rogawskiet et al., "Current understanding of the mechanism of action of the antiepileptic drug lacosamide," *Epilepsy Res.*, vol. 110, 2015, pp. 189–205.
- [18] J.A. Bradley et al., "In vitro screening for seizure liability using microelectrode array technology," *Toxicol. Sci.*, vol. 163, 2018, pp. 240–253.
- [19] P.H. St George-Hyslop and A. Petit, "Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease," *C. R. Biol.*, vol. 328, 2005, pp. 119–130.
- [20] B.W. Henderson et al., "Pharmacologic inhibition of LIMK1 provides dendritic spine resilience against β -amyloid," *Sci. Signal*, vol. 12, 2019, article no. 587.
- [21] Z. Šišková et al., "Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyper excitability in a mouse model of Alzheimer's disease," *Neuron*, vol. 84, 2014, pp. 1023–1033.
- [22] F. Yang et al. "Curcumin inhibits formation of amyloid β -oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, 2005, pp. 5892–5901.
- [23] H. Amin et al., "High-resolution bioelectrical imaging of $A\beta$ -induced network dysfunction on CMOS-MEAs for neurotoxicity and rescue studies," *Sci. Rep.*, vol. 7, 2017, article no. 2460.
- [24] A. Pelkonene et al., "Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived models of the brain with microelectrode arrays," *Cells*, vol. 11, no. 1, 2022, article no. 106.
- [25] R.F. Halliwell et al., "An electrophysiological and pharmacological study of the properties of human iPSC-derived neurons for drug discovery," *Cells*, vol. 21, 2021, article no. 1953.
- [26] D. Jans et al., "Action potential-based MEA platform for in vitro screening of drug-induced cardiotoxicity using human iPSCs and rat neonatal myocytes," *J. Pharmacol. Tox. Met.*, vol. 87, 2017, pp. 48–52.
- [27] A. Zwartsen et al., "Cardiotoxicity screening of illicit drugs and new psychoactive substances (NPS) in human iPSC-derived cardiomyocytes using microelectrode array (MEA) recordings," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 136, 2019, pp. 102–112.
- [28] A.E. Danku et al., "Organ-on-a-chip: A survey of technical results and problems," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, 2022, article no. 840674.
- [29] B. Molina-Martinez et al., "A multimodal 3D neuro-microphysiological system with neurite-trapping microelectrodes," *Biofabrication*, vol. 14, 2022, article no. 025004.
- [30] <https://www.science.org/content/article/us-epa-eliminate-all-mammal-testing-2035>.
- [31] D. Cabrera-Garcia et al., "Early prediction of developing spontaneous activity in cultured neuronal networks," *Sci. Rep.*, vol. 11, 2021, article no. 20407.