

양이온성 고분자 기반의 조직공학적 치료제 개발

Development of Polycation-based Tissue Engineering Applications

조혜란 · 김성준 · 박의선 · 조희정 · 김교범

Hyeran Cho · Sungjun Kim · Uiseon Park · Heejung Jo · Kyobum Kim

Division of Bioengineering, College of Life Sciences and Bioengineering,
Incheon National University, 119, Academy-ro, Yeonsu-gu, Incheon 22012, Korea
E-mail: kyobum.kim@inu.ac.kr

1. 서론

건강한 삶과 생명의 연장은 오랜 인류의 숙원이었다. 이를 이루어내기 위한 과학과 의료기술은 끊임없이 발전하고 있으며, 50세에 그쳤던 수명을 현재 100세까지 연장시켰다. 그럼에도 불구하고, 노화와 불의의 사고로 인해 생기는 조직의 손상은 자연치유도 어려울 뿐 만 아니라, 이를 완벽하게 원상태로 재생시키는 치료제의 개발 또한 아직은 완전하지 않다. 따라서 최근 조직공학분야에서는 줄기세포와 지지체, 그리고 신호전달물질을 활용하여 다양한 부위의 재생을 촉진시키기 위한 연구가 활발히 진행 중이다. 더 나아가 재생을 촉진시키기 위한 전달 물질의 보호와 지속적인 방출을 위해서 고분자 전달체를 개발하는 것도 중점 과제이다. 많은 연구에서 사람의 지방유래 성체줄기세포와 골수유래 성체줄기세포를 활용하여 효과적인 조직 재생을 유도하고 있으며, 세포의 성장과 분화를 위해 사용되는 지지체는 합성고분자와 천연유래고분자를 적절하게 개질하여 원하는 물성으로 조절하여 활용하고 있다. 줄기세포의 분화를 위해 투여하는 신호전달물질은 효과적인 체내 삽입과 지속적인 방출을 위해 다양한 전달체를 이용하여 체내에 삽입을 하고 있으며, 더 진보된 전달체를 개발하기 위한 노력도 이루어지고 있다. 현재 다양한 질병을 위한 조직공학적 제제는 활발하게 개발되고 있으며, 다양한 기술을 통한 산업화가 진행되고 있다.

2. 본론

2.1 다가양이온을 기반으로 한 약물전달체

일반적인 약물은 체내 반감기가 짧기 때문에 지속적인 복용이 필요하다. 또한 이를 위해 과량의 약물을 투여할 경우 환자에게 부작용을 야기할 수 있으며, 이를 방지하기 위해 적은 용량의 약물을 투여하게 되면 치료 효과가 나타나지 않거나, 체내에서 빠르게 분해되어 단기간 내 다회 복용이 필요하게 된다. 이를 극복하기 위해 조직공학 분야에는 단회 투여로 지속적인 치료 효과를 유지하게 해주는 약물 전달체의 개발이 진행되고 있다. 조직치

Author



조혜란
2017 인천대학교 생명공학부
생명공학전공 (학사)
2017 인천대학교 생명·나노
바이오공학과 (석사과정)



김성준
2018 인천대학교 생명공학부
생명공학전공 (학사)
2018 인천대학교 생명·나노
바이오공학과 (석사과정)



박의선
2018 인천대학교 생명공학부
생명공학전공 (학사)
2018 인천대학교 생명·나노
바이오공학과 (석사과정)



조희정
2018 인천대학교 생명공학부 생명공학전공
(학사)
2018 인천대학교 생명·나노바이오공학과
(석사과정)



김교범
2005 서울대학교 화학생명공학부 (학사)
2010 Univ. of Maryland 화학공학과 (박사)
2014-2017 인천대학교 생명공학부 조교수
2018 인천대학교 생명공학부 부교수

료를 위한 약물로는, 조직이 손상이 일어났을 때 빠른 재생을 위해 외인성 성장 인자를 주로 사용하며 이를 효과적으로 전달하기 위한 여러 방법들이 연구되고 있다. 그 중에서도 다가 양이온을 기반으로 한 전달체의 경우, 음전하를 나타내는 세포표면의 특징으로 인해, 정전기적 인력으로 양이온을 나타내는 전달체의 접근이 용이해져 전달 효율이 증가될 수 있다는 장점이 있다. 대표적인 다가양이온인, Poly(ethylene imine) (PEI)의 경우 독성이 강하고 단가가 높다는 경제적인 측면의 단점으로 의학적인 활용에 제한이 있다. 이를 극복하기 위해서, 우리 실험실에서는 poly(ethylene arginylaspartate diglyceride) (PEAD)라는 새로운 합성고분자를 사용했다. 이 물질은 생분해성 및 생체적합성이 우수하고, 수용액 상태에서 쉽고 빠르게 음전하를 띠는 헤파린과의 정전기적 인력을 통해 결합하여, 복합체인 코아세르베이트를 형성함으로써 성장 인자 및 뉴클레오타이드 등을 효과적으로 전달하는 것이 가능하다(그림 1). 성장 인자들과 헤파린 사이의 친화력을 바탕으로 성장 인자의 방출 속도를 조절할 수 있으며, 2가지 이상의 성장 인자를 전달하는데 이용될 경우 이들의 독립적 방출패턴 유지를 가능하게 하여 전략적 조직공학 응용의 폭을 넓혀준다.

2.1.1 흉터억제제로의 활용

PEAD를 활용한 코아세르베이트에 치료적 성장 인자를 담지하여 사용하는 한 예로, 우리 실험실에서는 흉터 형성 억제 분야에 이를 사용을 하였다. 상처 부위의 흉터 형성을 억제하기 위한 많은 연구가 진행이 되고 있으며, 현재 사용되고 있는 외과적 치료법으로는 레이저 치료, 방사능 치료, 냉동수술을 이용한 제거수술 등이 있으며 비수술적 방법으로는 실리콘드레싱 또는 비타민 E 기반의 점종법 등이 있다.^{1,2} 하지만 이러한 치료법은 회복기간이 길고 근본적인 조직 재생이 쉽지 않기 때문에, 이를 해결하기 위하여 조직공학적인 치료 제재가 새로운 대안으로 떠오르고 있다.

이를 위해 우리 실험실에서는 흉터 제거에 효과를 보인다고 알려진 성장 인자인 Interleukin-10(IL-10)³과 Transforming Growth Factor β -3(TGF- β)⁴를 동시 전달하여 조직공학적인 피부재생 효과를 기대하고 있다.

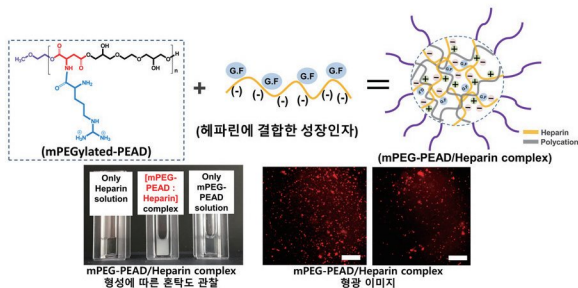


그림 1. 다가양이온을 기반으로 한 복합체 형성 확인.

앞에서 언급한 성장 인자들을 전달하기 위해 PEAD를 사용한 코아세르베이트를 이용하였다. 두 성장 인자가 담지된 코아세르베이트의 피부세포에 대한 효능을 확인하기 위해 WST-1 실험법을 이용하여 인간 섬유아세포의 증식을 확인하였으며, HaCaT 세포에 대한 이동능력을 확인하였다. 이 결과들을 통하여 이 전달체가 피부세포에 대해 세포증식과 세포 이동을 향상시키는 것을 알 수 있었다. 또한 동물실험을 통하여 Rat의 등 피부 절개 모델에 대해 깨끗하고 빠른 상처의 회복을 확인할 수 있었다. 게다가 RT-PCR을 이용한 *in vitro* 및 동물실험 환경에서의 유전자 발현 양상을 확인해 본 결과, 초기단계에 세포외기질의 형성이 활발하게 이루어지며 시간이 흐르면서 적절한 콜라겐의 발현과 흉터 관련 유전자들의 감소 및 Matrix metalloproteinase의 증가를 확인할 수 있었다. 또한 조직학 및 면역조직화학염색법 결과를 통하여 두 성장 인자를 전달한 그룹에 대해 적은 딱지(scab) 형성, 상처부위로 이동된 모낭 및 피지선, 깨끗한 표피의 형성 그리고 많은 신생혈관형성을 확인할 수 있었다. 더욱이 Picrosirius 염색을 통하여 콜라겐의 형태를 확인해 본 결과 정상조직과 같은 두껍게 잘 짜인 구조를 확인했다(그림 2). 이러한 결과를 토대로 다가양이온 기반의 코아세르베이트를 이용한 다중 성장 인자의 전달이 효과적으로 흉터 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 접근이 조직공학적인 흉터 형성 억제제로 활용이 가능할 것으로 기대한다.

2.1.2 PEGylation을 통한 PEAD의 안정성 개선

기존의 PEAD의 경우 합성하는 과정에서 tBOC이라는 보호 그룹이 붙여진 아스파르트 산 또는 아르지닌 산을 사용하였는데, 이 tBOC 그룹을 제거하는 과정이 까다롭기 때문에 이를 개선하기 위해 우리 실험실에서는 Fmoc 그룹이 붙여진

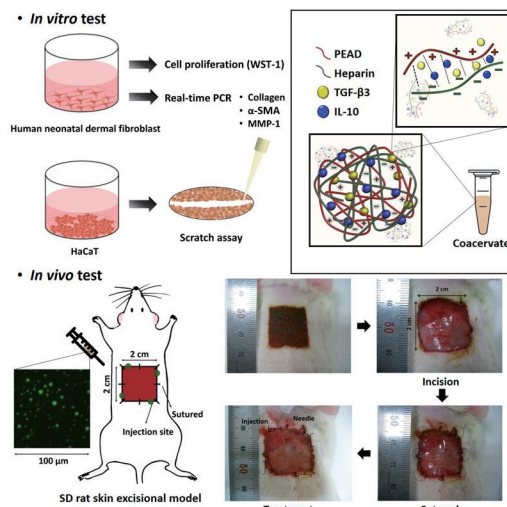


그림 2. 흉터억제를 위한 두 성장 인자가 담지된 다가양이온기반의 코아세르베이트를 이용한 실험 모식도.

산 물질을 사용하여 상대적으로 쉬운 방법을 통한 보호 그룹 제거를 가능하게 하였다.^{5,6} 또한, 다가양이온 기반의 코아세르베이트 전달체의 경우, 소수성 성질로 인하여 체내에서 코아세르베이트 입자 간 또는 혈액의 성분들과 응집하게 되면서 체내 반감기가 짧아지고, 이로 인하여 담지하고있는 성장 인자나 뉴클레오타이드의 활성이 감소된다는 단점을 가지고 있다.^{7,8} 따라서 우리 실험실에서는 친수성 성질을 증가시켜 이러한 단점을 극복하고자 대표적인 친수성 고분자인 Poly (ethylene glycol) (PEG)을 PEAD에 연결한 mPEG-PEAD를 합성하였으며, 이를 고농도로 세포에 처리하였을 때 독성이 나타나지 않았음을 통해 우리가 합성한 mPEG-PEAD의 세포적합성이 우수하다는 것을 알 수 있었다. 이외에도, 코아세르베이트의 형광염료를 이용하여 시간에 따른 응집 정도를 비교해보았을 때, PEG이 연결되어 있는 그룹에서 천천히 또 적게 응집이 일어나는 것을 확인했다. 또한, 고농도의 염 이온을 처리하여 복합체의 안정성을 평가해본 결과, PEG이 연결된 그룹에서 더 높은 안정성을 유지하고 있음을 확인했다. 성장 인자 전달체로서의 능력을 평가하기 위해 성장 인자의 탑재 효율 및 방출 패턴을 추적하는 실험을 수행했다. 그 결과, 기존의 PEAD와 마찬가지로 높은 탑재율을 보였고, 28일 이상 지속적으로 성장 인자를 방출 할 수 있음을 확인했다. 이 뿐만 아니라, 다가양이온의 분자량/길이/양이온성 정도를 변화시켜 세포내/체내 전달 속도 미세조절을 통하여 개선된 성장 인자 전달체에 활용할 수 있다(그림 1).

2.2 근골격계 조직 재생: 골·관절

근골격계는 인체를 지지하고 물리적 움직임을 가능하게 하는 중요한 시스템이다. 여기에 속하는 조직으로 뼈와 관절 등이 있으며 이들은 노화나 과격한 움직임, 그리고 외부 충격 등으로 인해 손상이 생기게 된다. 이렇게 손상된 근골격 조직

은 재생이 거의 이루어지지 않거나 시간이 오래 걸려, 한 번 손상되면 원상태로 복구되기 어려운 조직이다. 때문에 많은 연구들이 조직공학의 요소인 줄기세포, 신호물질, 지지체를 활용한 연구를 활발히 진행하고 있다(그림 3).

2.2.1 손상된 관절 조직의 재생

현재 외과적으로 이루어지고 있는 관절의 치료 방법으로는 인공관절 대체 및 히알루론산과 같은 관절의 세포 외 기질을 직접 주사하여 움직임과 고통을 완화시키는 방법 등이 있다. 이러한 접근법은 질병의 악화를 늦추고 통증을 감소시키기 위한 방법이므로, 손상된 조직을 재생시키지는 않는다. 따라서 많은 연구실에서는 조직공학적 재료를 개발하여 손상된 관절 조직을 원래의 조직같이 재생시키기 위한 연구들을 진행하고 있다.⁹ 줄기세포를 분화시키기 위해 사용하는 성장 인자로는 TGF- β family, IGF-1 등이 있다. TGF- β family의 경우, 배아 발생 과정에서 세포의 응집을 유도하여 관절 조직에서 관찰되는 Lacunae 구조를 형성하게 하며, IGF-1의 경우 관절세포의 증식과 분화를 유도하여 관절의 세포 외 기질 성분 합성을 증가시켜 관절 특유의 물성과 환경을 유지시켜 주는 데에 기여한다.¹⁰ 일반적으로 많이 사용하는 전달체는 PEI, 키토산 등의 양이온 기반의 고분자를 사용하지만, 앞에서 언급한 단점들을 극복하기 위해 우리 실험실에서는 PEAD와 Heparin으로 이루어진 코아세르베이트를 사용했다. 또한 이들을 손상된 관절 조직에 주입하고 세포가 관절부위에 머물러 분화하면서 손상부위를 재생시킬 수 있도록 하기 위한 지지체를 개발하였다. 이때 지지체는 관절 조직과 비슷한 물성을 갖으며, 관절 조직을 이루는 세포 외 기질 성분을 사용하여 제작할 경우 더욱 우수한 재생효과를 보인다고 알려져 있다.¹¹ 이러한 근거들에 입각하여 최근 하이드로젤 기반의 지지체가 각광을 받고 있다. 이러한 하이드로젤은 가교도 조절을 통해 원하는 물성을 부여할 수 있다는 장점을 갖고 있으며, 부피나 형태의 조절이 용이하여 손상 부위 따른 맞춤형 치료를 가능하게 해준다.¹²

우리 연구실에서는 IGF-1이 담지된 코아세르베이트와 지방 유래 성체줄기 세포를 젤라틴과 PEGDA로 이루어진 망상구조 하이드로젤 지지체에 넣어 사용하였다.

하이드로젤로부터 IGF-1의 방출은 코아세르베이트에 한 번 더 보호되었을 때가 그렇지 않은 경우보다 천천히 흘러나오는 양상을 나타내었다. 또한 이렇게 방출된 IGF-1이 정상적인 활성을 유지하는 지를 확인하기 위해, IGF-1이 유방암 세포인 MCF-7의 증식을 촉진시킨다는 특성을 이용하였다. 3주간 하이드로젤 및 코아세르베이트를 포함한 하이드로젤로부터 방출된 IGF-1을 MCF-7에 처리하였을 때, CellTiter blue 실험을 통해 세포의 증식이 촉진 된다는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 우리가 사용한 성장 인자 전달체가

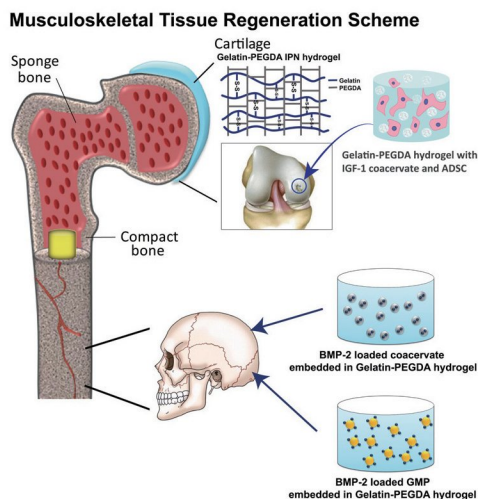


그림 3. 손상된 근골격계 재생을 위한 조직공학적 접근 방식의 모식도.

IGF-1 방출을 조절할 수 있으며, 방출된 IGF-1의 활성 또한 유지된다는 것을 입증한다. 줄기세포 분화 실험에서는 IGF-1을 감싼 코아세르베이트와 지방 유래 줄기세포가 gelatin-PEGDA 하이드로젤에 담지되어 '연골분화 유도 배지'에 배양했을 경우, 관절세포로의 분화 또한 촉진되는 것을 알 수 있었다. 따라서 IGF-1이 담지된 PEAD/Heparin 복합 코아세르베이트를 활용한 성체줄기세포의 분화 유도는 관절 치료제로서의 가능성을 시사한다.

2.2.2 임계크기 이상의 골 손실

뼈는 여러 종류의 세포, 다양한 기질로 구성되며, 높은 혈관 분포도를 갖는 복잡한 조직이다. 그렇기 때문에 골 재생은 복잡한 치료법을 요구한다. 또한, 임계크기의 골 손실은 일반적인 골절과는 달리 사람의 생명을 위협하며, 자연적인 치유가 불가능하다.¹³ 이를 치료하기 위해 두개골, 늑골, 대퇴골 등에서 이식하는 외과적 수술법을 사용하고 있으나, 이러한 접근은 환자에게 통증, 감염 등을 일으켜 이차적인 수술을 요구하게 만들 수 있다. 또한 골절의 크기가 커짐에 따라, 이식 부위의 손실이 커지기에, 이를 대체할 수 있는 물질 개발의 필요성이 요구되고 있으며, 하이드로젤이 이를 위한 대체재로 주목 받고 있다. 또한 이식용 대체재의 개발과 더불어, 골 재생을 촉진하기 위해 bone morphogenetic protein-2(BMP-2)라고 하는 대표적인 골 재생 유도 성장 인자를 사용하였다.¹⁴ 하지만 BMP-2의 고용량 및 직접 전달은 환자에게 염증, 골 손실 등을 유발할 수 있다. 이를 극복하기 위해 우리는 성장 인자의 서방형 전달체인 PEAD 기반의 코아세르베이트와 gelatin microparticle(GMP)을 사용해 BMP-2를 각각 담지한 뒤, 이를 gelatin-PEGDA 하이드로젤로 한번 더 둘러싸는 이중보호 전략을 채택하여 적용하였으며, 두 전달체의 효능을 비교하였다.^{12,15} 이러한 이중 보호 전략은 성장 인자의 단일 보호 보다 지속적인 방출을 나타내었으며, 결합원리에 입각하여 GMP보다 코아세르베이트에서 더욱 지속적인 방출 양상을 보였다. 이러한 전달체의 사용은 세포수준의 실험에서 BMP-2의 직접 적용보다 인간 골수 유래 성체줄기세포의 골분화를 촉진하였다. 또한 쥐(rat model)의 두개골 결함에 이식 한 뒤 4주 후에 micro-CT와 조직 염색법을 이용해 골 조직 재생 정도를 확인하였을 때, GMP에 BMP-2를 담지한 뒤 하이드로젤로 감싼 실험군에서 가장 높은 골 재생효과를 나타냈었으며, 이러한 결과는 성장 인자의 단순 지속방출보다 결합의 물리적 크기에 따른 적절한 방출 속도 및 양 조절이 골 재생에 더욱 중요하다는 것을 시사한다.

3. 결론

앞에서 우리가 제시한 다가양이온 기반의 코아세르베이트

트는 효과적으로 성장 인자의 방출을 조절할 수 있으며, 생체 내 효소 및 가수분해로부터 성장 인자를 보호할 수 있다. 코아세르베이트를 이용한 복합 성장 인자의 전달은 독립적 방출양상을 보였으며, 효과적인 피부재생 양상을 보였다. 이와 더불어 gelatin-PEGDA 하이드로젤은 기계적 움직임을 갖는 조직의 효과적인 지지체로 사용이 가능하였으며, 내부에 성장 인자를 담지한 코아세르베이트를 함께 사용하였을 때, 골조직 및 연골조직의 재생을 촉진시키는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 PEAD가 갖는 단점을 보완하기 위해 PEAD를 PEGylation시켜 친수성을 부여함으로써 코아세르베이트의 응집을 막아 안정성을 높일 수 있으며, 이를 활용한 실험을 활발히 진행하고 있다. 결론적으로 이 글에서 설명한 전달체 및 지지체는 앞으로 다양한 조직공학 분야에서 효과적이고 전략적인 기술로 활용될 것이라 기대한다.

참고문헌

1. C. Tziotziou, C. Profyris, and J. Sterling, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **66**, 13 (2012).
2. U. Park and K. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **22**, 659 (2017).
3. J. Shi, H. Wang, H. Guan, S. Shi, Y. Li, X. Wu, N. Li, C. Yang, X. Bai, W. Cai, F. Yang, X. Wang, L. Su, Z. Zheng, and D. Hu., *Arch. Dermatol. Res.*, **305**, 341 (2013).
4. M. Li, L. Qiu, W. Hu, X. Deng, H. Xu, Y. Cao, Z. Xiao, L. Peng, S. Johnson, L. Alexey, P.A. Kingston, Q. Li, and Y. Zhang, *Exp. Cell Res.*, **367**, 24 (2018).
5. M.P. Hwang, X. Ding, J. Gao, A.P. Acharya, S.R. Little, and Y. Wang, *Soft Matter*, **14**, 387 (2018).
6. H. Chu, J. Gao, and Y. Wang, *Biotechnol. Prog.*, **28**, 257 (2012).
7. H. Chu, N.R. Johnson, N.S. Johnson, and Y. Wang, *J. Control Release*, **150**, 157 (2011).
8. K. Kim, W.C.W. Chen, Y. Heo, and Y. Wang, *Prog. Polym. Sci.*, **60**, 18, (2016).
9. C. Chung and J. A. Burdick, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 243 (2008).
10. Goldring M. B., K. Tsuchimochi, and K. Ijiri, *J. Cell. Biochem.*, **97**, 33 (2006).
11. Nii M., J. H. Lai, M. Keeney, L. H. Han, A. Behn, G. Imanbayev, and F. Yang, *Acta Biomater.*, **9**, 5475 (2013).
12. K. Kim, J. Lam, S. Lu, P. P. Spicer, A. Lueckgen, Y. Tabata, M. E. Wong, J. A. Jansen, A. G. Mikos, and F. K. Kasper, *J. Control. Release*, **168**, 166 (2013).
13. J. T. Goodrich, A. L. Sandler, and O. Tepper, *Child's Nerv. Syst.*, **28**, 1577 (2012).
14. J. Park, S. Kim, K. Kim, *J. Pharm. Investig.*, **48**, 187 (2018).
15. H. Li, N. R. Johnson, A. Usas, A. Lu, M. Poddar, Y. Wang, and J. Huard, *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 667 (2013).