

생체 모사 환경을 이용한 세포 역학 연구

Cell Mechanobiology in Biomimetic Microenvironments

김 영 · 김병철 | Young Kim · Byoung Choul Kim

Major of Nano-Bioengineering, College of Life Science and Bioengineering, Incheon National University
Building 29, Room 606, 119 Academy-ro, Songdo-1-dong, Yeonsu-gu, Incheon 22012, Korea
E-mail: introbc@gmail.com

1. 서론

우리 몸속 세포는 주변 미세환경(microenvironment)에 반응하여 부착(adhesion), 퍼짐(spreading), 이동(migration) 등 세포 활동을 달리한다.¹ 또한, 생체 미세환경은 세포의 분화(differentiation), 성장(growth), 사멸(apoptosis) 등 세포의 성장과 운명을 결정짓는 중요한 요소이기도 하다. 때에 따라 생체 미세환경의 변화가 비정상적인 세포 활동을 촉진해 자가면역 질환, 암 전이와 같은 심각한 질환을 초래하기도 한다.^{2,4}

일반적인 세포의 외부 환경 인지 과정은 물리적·화학적 신호와 세포막에서 발현하는 수용체 단백질과의 상호작용을 통하여 이루어진다. 인테그린(integrin)을 비롯한 세포막 단백질들이 세포외 기질(extracellular matrix) 혹은 생화학적 신호(biochemical cue)를 인지 후, 세포 내에 생화학적 신호로 변환한다. 이 신호가 세포질과 핵으로 전달되고, 관련된 유전자를 발현시킴으로써 다양한 세포 반응을 유도한다.^{5,6} 이 과정에서, 액틴(actin), 미소관(microtubule)과 같은 세포 골격 구조체(cytoskeleton), 부착 단백질(adhesion protein), 그리고 국소접착 구조체(focal adhesion complex) 등이 깊이 관여하며, 세포의 물리적 특성과 역학에 큰 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.⁷

최근 고분자 재료의 응용과 마이크로/나노 구조 제작 기술의 발달은 정밀한 생체 모사 환경 조성을 가능하게 한다. 기존의 세포 연구는 플라스틱 디쉬와 같은 인위적 조건(*in vitro*)에서 진행되어왔다. 하지만, 이 실험 조건은 실제 세포 주변 환경의 물리적 구조 및 화학적 특성과는 큰 차이가 있으며, 얻어진 세포 반응 역시 실제 생체 조건(*in vivo*)에서 얻어진 결과와 불일치하는 모습을 보인다. 따라서, 실험 조건과 실제 생체 환경과 차이는 세포생물학적 이해를 방해할 뿐만 아니라, 약물 및 의학적 치료법 개발을 제한하는 주된 원인으로 지적되어 왔다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 연구원들은 생체 적합성 고분자를 활용하여 세포 주변환경과 비슷한 물리적 강성 조건을 재현하였으며, 반도체 공정을 이용한 마이크로/나노 구조 제작 기술을 바탕으로 세포 주변의 미세 구조를 구현하였다.

본 특집에서는 생체 모사 환경을 이용한 세포 역학 연구를 중점적으로 다루고자 한다. 생체 모사 환경의 종류에 따라 1) 강성(stiffness) 환경 모사, 2) 위상(topology)과 지형(geometry) 환경 모사, 3) 생화학적(biochemical) 환경 모사, 4) 외력(external physical force) 환경 모사로 나누어, 각각 모사 환경을 구현하는 원리와 방법 그리고 실제 세포 연구 사례를 소개할 것이다(그림 1).

Author



김 영

2018

인천대학교 나노바이오공학과 (학사)

2018-현재

인천대학교 생명·나노바이오공학과 (석사과정)



김병철

2008

연세대학교 생명공학과 (학사)

2010

University of Michigan 의공학과 (석사)

2014

University of Michigan 고분자공학과 (석사)

2014

University of Michigan 의공학과 (박사)

2017-현재

인천대학교 생명공학부 나노바이오 전공 조교수

2. 본론

2.1 생체조직의 강성모사와 세포반응

우리 몸을 구성하는 조직들은 위치와 종류에 따라 각기 다른 강성을 보이며, 세포 반응에 영향을 미치는 것으로 알려졌다(그림 2a).⁸ 뇌와 같이 연한 조직이 있는 반면, 뼈와 같이 단단한 조직도 있으며, 신경세포와 골세포처럼 각 조직에서 발견되는 세포의 모양과 역할이 다르다. 이러한 사례를 통해, 세포가 조직의 위치에 따라 다른 크기의 물리적·기계적 자극(physical/mechanical cues)을 인지하며, 이것이 세포 형태 및 반응에 큰 영향을 줄 수 있음을 어렵지 않게 추측할 수 있다. 따라서, 인체 조직과 비슷한 강성을 갖는 생체 모사 환경을 구현하여, 주변 환경이 세포에 미치는 영향을 연구할 수 있다.

인체 조직의 강직도를 재현하기 위하여, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol(PEG)), 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide(PAA)), 아가로스 젤(agarose gel), 폴리디메틸 실록산(polydimethylsiloxane(PDMS)) 등 생체 적합성 고분자 화합물이 널리 활용되고 있다.⁹⁻¹¹ 각각 고분자를 경화시키는 과정에서, 단량체(monomer)와 가교제(cross-linker)의 혼합 비율을 조정함으로써, 생체 조직과 흡사한 강성을 갖도록 조절할 수 있다.

이렇게 제작된 강성 모사 환경을 이용하여, 주변 환경의 물성에 따른 세포반응과 변화에 대한 다양한 연구가 이루어져 왔다. Dennis E. Discher 교수 연구팀은 중간엽 줄기세포가 외부 물성에 따라 서로 다른 계통으로 분화되는 것을 관찰하였다.¹² 서로 다른 강직도를 가지는 폴리아크릴아마이드 젤 위에서 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 그 결과, 뇌 조직과 비슷한 강직도(0.1-1 kPa)를 갖는 젤에서 배양한 줄기세포는 많은 신경세포 특이적 유전자를 발현하였으며, 신경세포와 유사한 돌기를 갖는 형태로 분화되었다. 또한, 근육 조직과 비슷한 강직도(8-17 kPa)를 갖는 젤에서 배양한 줄기세포는 높은 수준의 근육세포 특이적 유전자 발현하고, 가늘고 긴 근육세포의 모습으로 분화되었다. 그리고 뼈에 붙은 콜라

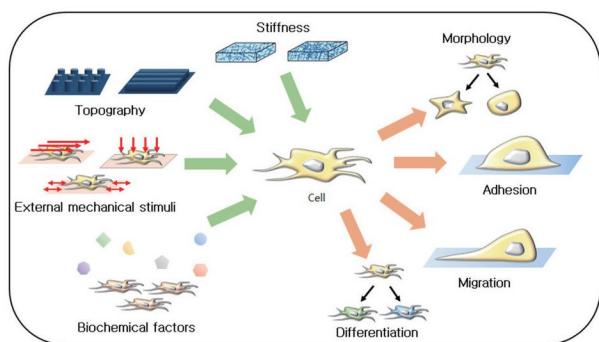


그림 1. 다양한 생체 모사 요인과 세포 반응.

겐과 비슷한 강직도(25-40 kPa)를 갖는 젤 위에서 배양한 줄기세포는 골 형성 표지자(osteogenic marker)를 발현하고, 다각형 모양을 띤 조골세포(osteoblast)의 모습으로 분화되었다. 이 결과는, 세포가 인지하는 물리적 자극이 줄기세포 분화의 방향성 결정에 중요한 요인임을 보여준다.

세포 주변 환경의 물리적 강성은 세포의 부착과 퍼짐 그리고 고운동성에도 큰 영향을 준다. 이러한 상관관계를 밝히기 위하여, Paul A. Janmey 교수 연구팀에서는 서로 다른 강직도를 갖는 폴리아크릴아마이드 젤 위에서 섬유아세포(fibroblast)와 내피세포(endothelial cell)를 배양 후 세포형태를 관찰하였다.¹³ 젤의 강성이 높을 때(2.9-28.6 kPa), 세포막 단백질인 인테그린이 활성화되어 세포 외 기질과 강한 결합을 하고, 액틴 섬유의 합성을 촉진시켜, 안정적인 세포부착과 퍼짐이 관찰되었다(그림 2c).¹³ 반면에, 낮은 강성을 보이는 젤(< 200 Pa)에서는 인테그린의 비활성화로 인하여 세포 부착이 불안

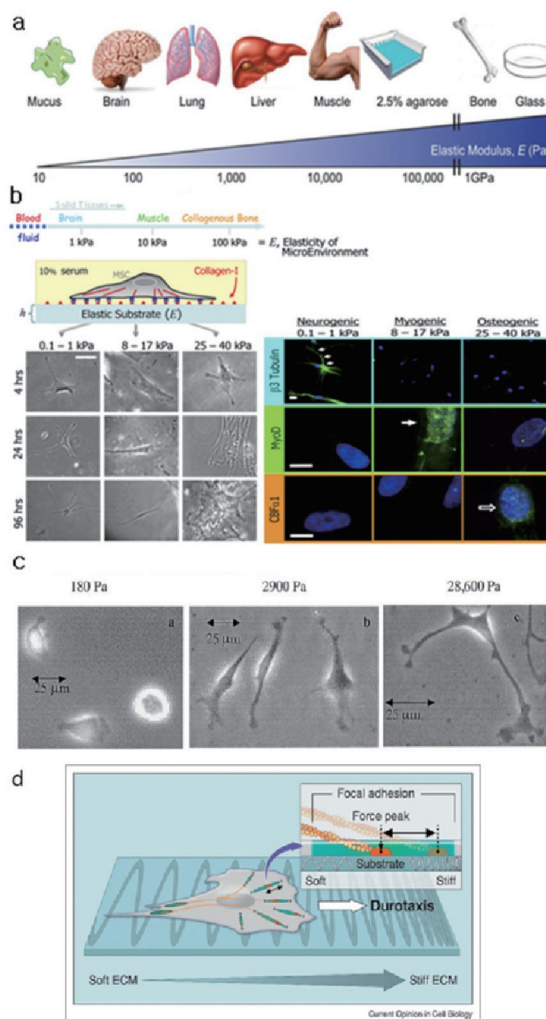


그림 2. 생체 조직의 강성 모사와 세포 반응: (a) 인체 조직별 강직성 모식도,⁸ (b) 서로 다른 강직도를 갖는 고분자 표면에서 줄기세포의 분화,¹² (c) 서로 다른 강직도를 갖는 표면에서 세포 부착 및 퍼짐,¹³ (d) durotaxis의 개념도.¹⁵

정할 뿐만 아니라, 이후 세포 퍼짐 역시 잘 이루어지지 않을 수 있었다(그림 2c). 나아가 Yu-li Wang 연구팀은 더 높은 강성을 갖는 표면에서 세포의 움직임이 촉진되며, 세포 주변 더 높은 강성을 갖는 쪽으로 세포가 움직이는 현상(durotaxis)을 보고하였다(그림 2d).¹⁴⁻¹⁵ 이 결과는 세포의 움직임 역시 주변 환경의 강성에 영향을 받는 사실을 보여준다.

2.2 생체조직의 위상과 지형 모사와 세포반응

기존 *in vitro* 실험은 평평한 표면에서 세포를 배양하고, 다양한 종류의 생화학적 자극에 따른 세포 변화를 관찰함으로써 얻은 결과들이 대부분이다. 하지만, 인체 조직은 미세섬유 구조, 미세구멍, 미세돌기, 모세혈관 구조 등 다양한 위상과 지형적 요소를 포함하고 있다. 그러므로, 최근 인체 내 미세구조를 재현하고, 위상과 지형 요소들이 세포 반응에 어떠한 영향을 미치는지 많은 연구가 진행되고 있다.

반도체 공정의 응용으로 작게는 수십 나노미터에서 크게는 수백 마이크로미터까지 정밀한 미세구조 제작이 가능하게 되었다(그림 3a). 이렇게 제작된 미세구조 표면을 세포의 부착을 유도하는 fibronectin, RGD 펩타이드, 콜라겐(collagen) 등 세포 외 기질 분자로 코팅함으로써, 세포의 위상 차이에 따른 반응을 관찰할 수 있다. Paul F. Nealey 교수 연구진은 세포가 평평한 표면에서는 원형을 유지하며 부착하는 반면, 세포 크기보다 작은 평행한 홈 구조(groove structure) 위에서 구조체의 방향성을 따라 길게 늘어나는 현상을 관찰하였다(그림 3b).¹⁶⁻¹⁸ Christopher S. Chen 교수 연구팀은 세포 외 기질의 면적을 조절하여, 줄기세포의 모양에 따른 분화를 연구 하였다(그림 3c).¹⁹⁻²⁰ 마이크로 컨택 프린팅(micro-contact printing) 방법을 이용하여, 유리 표면 위에 정밀하게 디자인된 마이크로 미터 크기의 세포 외 기질을 패턴 후, 인간 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cells, hMSCs)를

배양하였다. 그 결과 세포 외 기질 패턴의 크기에 따라 세포의 부착 및 퍼짐 정도를 조절할 수 있었다. 이밖에, 제한된 영역에 세포의 퍼짐이 제한된 경우 지방생성 분화(adipogenic differentiation)가 일어난 반면, 세포의 부착 면적이 충분히 넓을 경우, 골 형성 분화(osteogenic differentiation)가 일어나는 현상을 발견하였다(그림 3c).¹⁹⁻²⁰

나노 기둥(nanopillar), 나노 홈(nanogroove), 나노 채널 등 나노 구조체 역시 세포 역학 연구에 응용되었다. Joachim P. Spatz와 그 동료들은 나노 크기로 패턴 된 세포 외 기질 분자 위에 세포를 배양함으로써, 인테그린 분자가 외부 물리적 신호를 인지하고, 국소접합 구조체를 형성하기 위해서는, 인테그린 분자 간 거리가 평균 70 nm 이하이어야 함을 밝혔다.²¹ 또한, 그들은 다양한 크기의 나노 기둥 구조체 위에서 세포의 운동은 접촉면의 크기와 구조 간 거리에 따라 다른 양상을 보이는 것을 보고하였다.²² 더불어, Andre Levchenko 연구팀은 나노 기둥과 세포 외 기질의 밀도가 다른 조건에서 암세포의 이동을 관찰하였다(그림 3d).²³ 이 연구에서, 전이성 흑색종 세포(invasive melanoma cell)가 높은 phosphoinositide 3-kinase (PI(3)K)-Akt 신호전달 체계의 활성화로 쉽게 돌출부(protrusion) 구조를 만들어, 나노 기둥의 밀집도가 더 낮은 영역으로 더 큰 기질 접촉을 이루며 이동하는 현상을 관찰하였다. 반대로, 높은 Rho-associated protein kinase(ROCK)-myosin light-chain kinase(MLCK) 신호전달 체계의 활성화로 인하여 상대적으로 단단한 특성을 갖는 비전이성 흑색종 세포가 나노 기둥의 밀집도가 높은 영역으로 움직이는 현상을 보였다. 이 결과는 세포의 물리적 특성과 주변 세포 외 기질의 구조적 특성이 세포 이동에 복합적으로 영향을 미치는 것을 보여준다(topotaxis).

이밖에, 단단한 고분자 표면에 균열을 일으켜 마이크로 혹은 나노 크기의 구조를 제작하여, 섬유 형태의 지형적 요소를 재현한 시도(그림 3e) 등 다양한 방법을 통하여²⁴ 생체 모사 위상과 지형의 구현과 세포 반응을 연구하려는 시도가 이루어지고 있다.

2.3 생화학적 환경 모사와 세포반응

세포는 생화학적 인자를 인지하고, 농도에 따라 다른 반응을 보인다. 따라서, 약물과 성장인자 등 생화학적 인자가 세포 활동에 미치는 영향에 대해 활발한 연구가 진행되어 왔다.

미세유체(microfluidics) 기술은 인체생리학적 환경과 유사한 미세 구조 내에서 세포를 배양하고, 동시에 효과적으로 생화학적 인자의 농도 구배를 형성할 수 있다.²⁵ 이 방법을 활용하여, 생화학적 농도 구배에 따른 세포의 움직임인 주화성(chemotaxis)을 확인할 수 있다. Andre Levchenko 연구팀은 미세유체 칩을 이용하여, 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF) 농도 구배 조건에서, 암세포의 이동을 관찰하

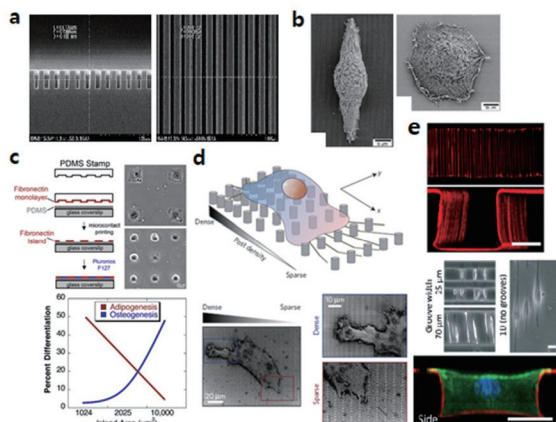


그림 3. 생체 조직의 위상 및 지형 모사와 세포반응: (a) 미세위상과 지형구조 이미지, (b) 미세지형에 따른 세포 부착의 변화,¹⁸ (c) 세포 외 기질의 면적에 따른 세포 부착과 줄기세포의 분화 양상,¹⁹⁻²⁰ (d) 나노 기둥의 밀도 구배에서 세포의 움직임 관찰,²³ (e) 균열을 이용한 미세섬유 모방구조와 세포 부착.²⁴

였다(그림 4a).²⁶ 일반적으로 정상 세포는 세포 사이 접촉이 일어나면, 세포의 움직임이 멈추는 특성(contact inhibition of locomotion, CIL)을 보이는 것으로 알려져 있다.²⁷ 그러나, 전이성 유방암세포는 CIL을 극복하고 높은 성장인자가 있는 곳으로 이동하는 주화성을 보였다.²⁶ 비슷한 원리로, 다른 연구에서는 면역세포가 혈관 사이를 비집고 이동하는 과정을 모사하여, 혈액 내 존재하는 면역세포들이 감염 부위에서 나오는 사이토카인(cytokine)들을 인지하고, 감염원으로 서서히 이동하는 과정을 재현할 수 있었다.²⁸⁻²⁹

미세유체 시스템은, 마이크로 밸브, 펌프 등 모듈을 활용하여 유체의 흐름을 정밀하게 조절할 수 있는 장점이 있다. 특히, 생화학적 인자의 노출 시간을 조절함으로써 노출 주기에 따른 세포 반응을 관찰할 수 있다(그림 4b).³⁰ 이 시스템을 이용하여, 인간 횡문근육종(Kym-1) 세포와 헬라(Hela) 세포가 신호전달 물질 중 하나인 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)에 노출되는 주기가 1분일 때가, 1시간 주기로 노출하였을 때보다 효과적으로 세포 사멸이 일어남을 밝혔다. 이로써, TNF의 농도뿐만 아니라, 노출 주기 역시 세포 운명 결정에 중요한 요소임을 보였다.

2.4 외력에 의한 자극 모사와 세포반응

인체 내에는 다양한 종류의 외력을 받는 조직이 존재한다. 예를 들어, 폐는 지속적으로 수축·이완을 반복하며, 폐 조직에 주기적인 인장력과 압축을 가한다. 이 과정에서, 폐 조직 내 세포는 지속적으로 외력에 노출되어, 세포의 구조와 물리적 특성을 유지하지만, 비정상적인 외력의 발생으로 폐섬유

화 등 질병을 초래하기도 한다. 이러한 현상을 실험적으로 재현하기 위하여, Donald Ingber 교수 연구팀은 미세유체칩을 이용한 인공 폐칩(lung on a chip)을 고안하였다.³¹ 폐에서 공기와 혈류가 마주하는 폐포 구조를 재현하고, 더불어 숨을 들이쉬고 내쉴 때 주기적으로 팽창·수축할 수 있도록, PDMS 탄성체를 이용한 마이크로 칩을 제작하였다. 폐칩에 폐포 조직을 구성하는 상피세포와 내피세포를 동시 배양하여, 생리적 환경을 구현하고, TNF- α 혹은 대장균 감염에 따른 면역세포의 움직임을 효과적으로 관찰하였다. 또한, 주기적으로 가해지는 외력이, 폐포 상피세포가 공기에 존재하는 나노입자의 흡수를 증가시켜, 세포 독성을 강화한다는 사실을 밝혀냈다.

Paul Krebsbach 교수와 Shuichi Takayama 교수 공동연구팀은 PDMS 탄성체를 이용하여, 미세유체 내부에 인장력을 가해줄 수 있는 구조로 칩을 제작하여, 배아 발생과정 중, 자궁의 수축과 이완이 배아줄기세포의 분화에 미치는 영향 연구하였다.³² 실험 결과, 단축 방향으로 가해진 인장력이 전분화능(pluripotency)과 중배엽 분화와 관련된 전사인자들의 재배치를 유도하여, 관련 유전자의 발현을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

이 밖에, 미세유체 칩은 혈류가 흐르는 인공혈관 모델³³ 등 다양한 분야에 걸쳐, 인체 내부 조직을 모사하고, 세포에 가해지는 외력에 따른 세포의 반응과 관련 질병 연구에 널리 활용되고 있다.

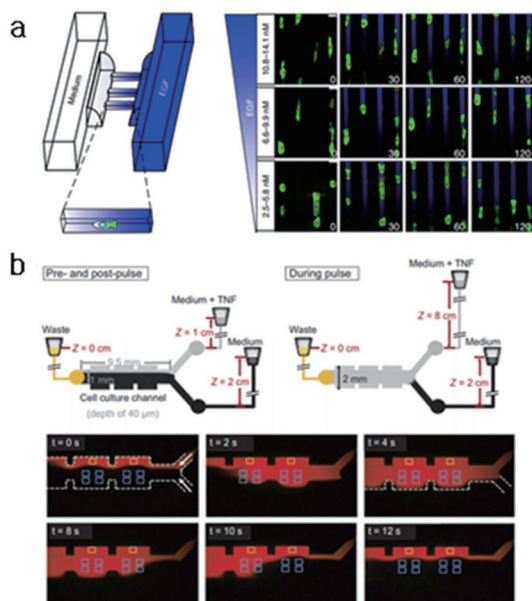


그림 4. 생체 내 생화학적 환경 모사: (a) 미세유체 칩에서 성장인자 농도 구배 형성과 세포의 이동,²⁶ (b) 성장인자 노출 시간 제어 미세유체 칩.³⁰

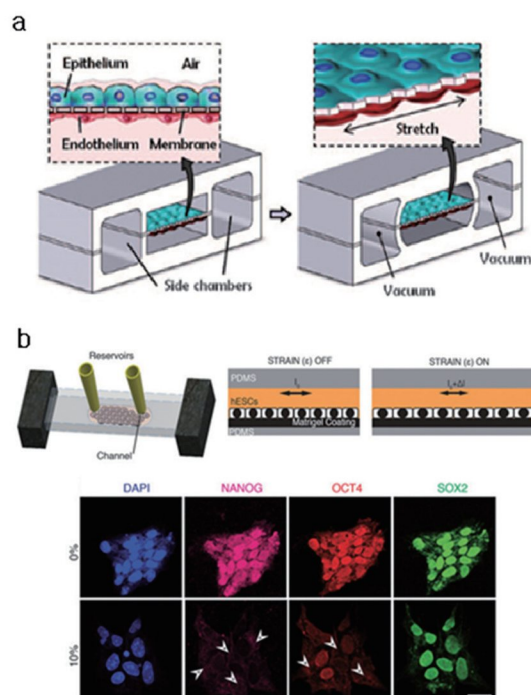


그림 5. 생체 내 외력에 의한 세포 자극 모사: (a) 폐 구조를 모사한 인공 폐칩,³¹ (b) 인장력 환경을 모사한 마이크로 칩과 배아줄기세포 분화.³²

3. 결론

본 특집에서는 생리학적으로 유사한 생체 모사 구조에서, 세포의 외부환경 인지 및 반응을 사례를 통하여 알아보았다. 본문에서 다룬 것과 같이, 세포 외부환경의 강직성, 지형적 특성, 생화학적 환경, 그리고 외부 물리력에 따른 자극 등 개별적 요인에 따라 다른 세포 반응을 보이는 것이 밝혀졌다. 하지만, 실제 생체 내에서는 위 환경 인자들이 복합적으로 일어난다. 이러한 사실을 고려하여, 더욱 실제 환경에 가까운 조건에 따른 세포의 반응을 연구하기 위해서는, 여러 외부 요소들을 결합한 시스템 구축을 통하여 여러 자극에 대한 세포 반응을 종합적으로 이해할 수 있는 연구들이 필요하다. 각 과정에서 얻어진 생물학적 지식은 세포에 대한 이해를 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 효과적인 약물 조건 등 임상적 응용에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 특집은 2018년도 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단 나노소재기술사업의 지원을 받았습니다(K190319007).

참고문헌

1. H. Wolfenson, B. Yang, and M. P. Sheetz, *Annu. Rev. Physiol.*, **81**, 585 (2019).
2. C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber, *Science*, **276**, 1425 (1997).
3. J. A. Joyce and J. W. Pollard, *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 239 (2008).
4. D. Li, J. Zhou, F. Chowdhury, J. Cheng, N. Wang, and F. Wang, *Regen. Med.*, **6**, 229 (2011).
5. L. B. Case and C. M. Waterman, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 955 (2015).
6. R. O. Hynes, *Cell*, **69**, 11 (1992).
7. B. D. Hoffman, C. Grashoff, and M. A. Schwartz, *Nature*, **475**, 316 (2011).
8. J. M. Barnes, L. Przybyla, and V. M. Weaver, *J. Cell Sci.*, **130**, 71 (2017).
9. K. J. Le Goff, C. Gaillard, W. Helbert, C. Garnier, and T. Aubry, *Carbohydr. Polym.*, **116**, 117 (2015).
10. J. H. Park, K. D. Park, and Y. H. Bae, *Biomaterials*, **20**, 943 (1999).
11. R. J. Pelham and Y. -I. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 13661 (1997).
12. A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, *Cell*, **126**, 677 (2006).
13. T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P. A. Janmey, *Cell Motil.*, **60**, 24 (2005).
14. C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang, *Biophys. J.*, **79**, 144 (2000).
15. S. V. Plotnikov and C. M. Waterman, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25**, 619 (2013).
16. P. Clark, P. Connolly, A. S. Curtis, J. A. Dow, and C. D. Wilkinson, *Development*, **99**, 439 (1987).
17. P. Clark, P. Connolly, A. S. Curtis, J. A. Dow, and C. D. Wilkinson, *Development*, **108**, 635 (1990).
18. A. I. Teixeira, G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy, and P. F. Nealey, *J. Cell Sci.*, **116**, 1881 (2003).
19. F. Guilak, D. M. Cohen, B. T. Estes, J. M. Gimble, W. Liedtke, and C. S. Chen, *Cell Stem Cell*, **5**, 17 (2009).
20. R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, *Dev. Cell*, **6**, 483 (2004).
21. M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantelehnner, H. Kessler, and J. P. Spatz, *ChemPhysChem*, **5**, 383 (2004).
22. E. A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, and J. P. Spatz, *Biophys. J.*, **92**, 2964 (2007).
23. J. Park, D.-H. Kim, H.-N. Kim, C. J. Wang, M. K. Kwak, E. Hur, K.-Y. Suh, S. S. An, and A. Levchenko, *Nat. Mater.*, **15**, 792 (2016).
24. C. Moraes, B. C. Kim, X. Zhu, K. L. Mills, A. R. Dixon, M. D. Thouless, and S. Takayama, *Lab Chip*, **14**, 2191 (2014).
25. D. Irimia, D. A. Geba, and M. Toner, *Anal. Chem.*, **78**, 3472 (2006).
26. B. Lin, T. Yin, Y. I. Wu, T. Inoue, and A. Levchenko, *Nat. Commun.*, **6**, 6619 (2015).
27. M. Abercrombie and J. E. M. Heaysman, *Experimental Cell Res.*, **6**, 293 (1954).
28. N. Gopalakrishnan, R. Hannam, G. P. Casoni, D. Barriat, J. M. Ribe, M. Haug, and Ø. Halaas, *Lab Chip*, **15**, 1481 (2015).
29. C. N. Jones, J. Dalli, L. Dimisko, E. Wong, C. N. Serhan, and D. Irimia, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 20560 (2012).
30. R. E. C. Lee, M. A. Qasaimeh, X. Xia, D. Juncker, and S. Gaudet, *Sci. Rep.*, **6**, 39519 (2016).
31. D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, and D. E. Ingber, *Science*, **328**, 1662 (2010).
32. T. Topal, B. C. Kim, L. G. Villa-Diaz, C. X. Deng, S. Takayama, and P. H. Krebsbach, *Integr. Biol.*, **11**, 41 (2019).
33. J. W. Song, S. P. Cavnar, A. C. Walker, K. E. Luker, M. Gupta, Y. C. Tung, G. D. Luker, and S. Takayama, *PLoS One*, **4**, e5756 (2009).