

마이크로 광 조형 기술을 이용한 연골조직 재생용 3 차원 인공지지체 개발

이승재[†], 강태연^{*}, 박정규^{**}, 이종원^{***}, 한세광^{**}, 조동우^{*}

Development of Three-dimensional Scaffold for Cartilage Regeneration using Microstereolithography

Seung-Jae Lee, Taeyun Kang, Jung Kyu Park, Jong-Won Rhie, Sei Kwang Hahn
and Dong-Woo Cho

Key Words : Microstereolithography(마이크로 광 조형), Scaffold(인공지지체), Cartilage(연골),
Tissue engineering(조직공학)

Abstract

Conventional methods for fabricating three-dimensional (3-D) scaffolds have substantial limitations. In this paper, we present 3-D scaffolds that can be made repeatedly with the same dimensions using a microstereolithography system. This system allows the fabrication of a pre-designed internal structure, such as pore size and porosity, by stacking photopolymerized materials. The scaffolds must be manufactured in a material that is biocompatible and biodegradable. In this regard, we synthesized liquid photocurable biodegradable TMC/TMP, followed by acrylation at terminal ends. And also, solidification properties of TMC/TMP polymer are to be obtained through experiments. Cell adhesion to scaffolds significantly affects tissue regeneration. As a typical example, we seeded chondrocytes on two types of 3-D scaffold and compared the adhesion results. Based on these results, the scaffold geometry is one of the most important factors in chondrocyte adhesion. These 3-D scaffolds could be key factors for studying cell behavior in complex environments and eventually lead to the optimum design of scaffolds for the regeneration of various tissues, such as cartilage and bone.

1. 서 론

조직공학(tissue engineering)은 손상된 생체조직을 체외에서 세포배양을 통해서 인공적으로 조직을 만들어 손상된 부분에 이식을 함으로써 장기의 기능이나 손상된 부분을 복원하는 것을 연구하는 학문이다⁽¹⁾. 이렇게 필요한 조직을 채취하여 세포를

배양, 증식시켜 새로운 조직 및 장기를 형성하려면 3 차원의 인공지지체(scaffold)가 반드시 필요하다. 이러한 인공지지체는 다음과 같은 조건을 충족시켜야 한다. 우선, 재생하고자 하는 생체조직의 형태를 유지하여야 하고, 배양하고자 하는 세포의 점착과 증식, 분화를 효과적으로 유도하며, 높은 생체친화성과 지지체로서의 역할을 다한 후 생체 내에서 안전하게 흡수, 분해되어야 한다.

이러한 인공지지체를 사용하여 연골을 재생하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있지만 아직까지도 완벽한 치료법이 없는 것으로 알려져 있다. 연골조직은 인체 중에서도 아주 독특한 조직으로써 혈관이 없고, 신경 또한 없으며, 한번 손상되면 재생이 거의 되지 않는 특징을 가지고 있다. 연골세포는 낮은 산소 요구량을 가지며, 확산에 의해 영

[†] 회원, 포항공과대학교 기계공학과
E-mail : sjlee411@postech.ac.kr
TEL : (054)279-2863 FAX : (054)279-5899

^{*} 포항공과대학교 기계공학과

^{**} 포항공과대학교 신소재공학과

^{***} 가톨릭의과대학교 성형외과

양분을 공급 받으며 생명력을 유지할 수 있기 때문에 적절한 배양액 내라면 체외에서도 생명력을 유지한 채 몇 주간 보관될 수 있다. 이러한 연골 세포들을 이용하여 조직공학으로 새로운 연골을 생성하기 위해서는 몇 가지 조건이 선행되어야 한다. 우선, 체내에서는 잘 증식되지 않은 연골 세포를 잘 증식시키고, 외형적으로나 구조적으로나 최초의 표현형(phenotype)을 잘 유지할 수 있는 세포 환경을 만드는 것이 중요하다. 또한 세포를 부착시키게 되는 고분자지지체가 물리적 형태를 정확히 유지하면서, 확산을 통하여 세포에 최적의 영양분을 제공해 줄 수 있어야 한다.

본 논문에서는 마이크로 광 조형 기술을 적용하여 3 차원 인공지지체를 제작할 수 있는 방안을 제시하였으며, 생체내/외 실험을 통하여 연골 조직 재생 가능성을 확인하였다.

2. 마이크로 광 조형 시스템

2.1 공리적 설계를 적용한 시스템의 구성

공리적 설계 기법을 적용하여 실제로 시스템을 구성하여 보았다⁽²⁾. Fig. 1 은 공리적 설계 기법을 적용하여 새롭게 구성된 마이크로 광 조형 장치의 개략도이다. Fig. 2 는 실제 제작된 마이크로 광 조형 시스템의 사진이다.

본 연구팀에서 개발한 기존의 마이크로 광 조형 장치와의 가장 큰 차이점은 x-y-z 스테이지를 x-y 스테이지와 z 스테이지로 각각 분리하여 시스템의 설계행렬을 coupled design 에서 decoupled design 으로 변화시켰다는 것이다. 즉, 기존의 시스템에서는 일체화된 x-y-z 스테이지에 부착된 엘리베이터를 수지 안에서 구동하여 성형을 하는 방식이었다. 이러한 방식에서는 수지 내부에 위치한 엘리베이터의 이동 속도에 의하여 수지의 층 두께가 변하게 되는 단점이 있다.

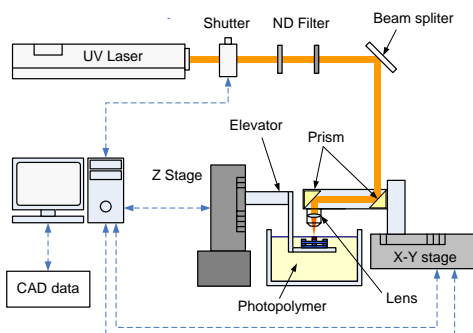


Fig. 1 Schematic drawing of new scaffold fabrication apparatus

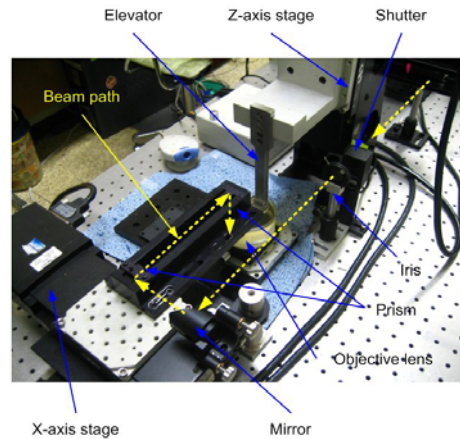


Fig. 2 Photograph of newly developed microstereolithography system using the axiomatic approach

하지만 공리적 설계 기법을 적용한 새로운 시스템에서는 광학 부품들이 부착된 x-y 스테이지를 독립적으로 구동시켜 레이저 빛의 경로가 수지 밖에서 제어되도록 하였다. 또한 경화되는 각각의 층 두께는 별도로 분리된 z 스테이지에 의하여 제어된다. 따라서 이전 시스템에서 발생한 스테이지 구동에 따른 수지 점성에 대한 영향을 제거시켰다.

한편 새로운 시스템에서는 x-y 스테이지 위에 광학 미러 대신 2 개의 직각 프리즘을 사용하였고 렌즈와 프리즘을 하나의 단일 부품으로 집적화하였다. 이는 설치되는 광학 부품들의 부피 및 무게를 감소시키므로 x-y 스테이지가 구동될 때 진동에 의하여 발생하는 오차 및 관성력을 줄일 수 있었다. 또한 정밀 가공된 부품으로 렌즈 및 프리즘을 고정시키므로 레이저 빛을 정확히 직각으로 반사시킬 수 있으며, 이는 광축 정렬을 보다 쉽고 정확하게 하여 광학 오차를 줄일 수 있었다.

3. UV 경화성 생체고분자

3.1 UV 경화성 생체고분자 합성

마이크로 광 조형 기술을 이용하여 인공 지지체를 제작하기 위해서는 UV 에 경화되는 고분자 재료가 필요하다. 따라서, 본 연구에서는 TMC (trimethylene carbonate)/TMP(trimethylol propane)를 사용하여 UV 에 경화되는 생분해성 고분자를 합성하였다⁽³⁾. Fig. 3 은 TMC/TMP 를 합성하는 단계별 반응 공정에 대한 개략도이다. TMP 를 개시제로 하여 질소 기류에서 200℃에서 4 시간, 160℃에서 2 시간 가열하여 TMC 를 고리열림 반응을 통하여 올리고머(oligomer)를 합성하였다.

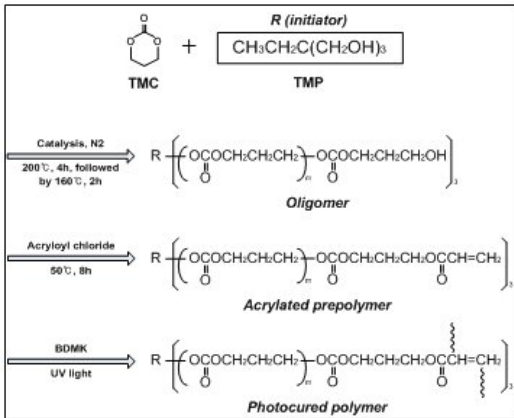


Fig. 3 Schematics of preparation routes of (co)oligomer and acrylate-end-capped prepolymer and photocuring

이 올리고머의 말단에 acryloyl chloride 를 적절한 반응비로 반응시켜 아크릴기가 도입된 고분자를 합성하고, 여기에 광개시제(BDMK)를 사용하여 광 경화 반응을 촉진시켰다.

3.2 성형특성 분석

새로운 생체고분자를 합성하여 마이크로 광 조형 장치에 적용하기 위해서는 레이저 주사 조건 및 형상에 따른 성형특성이 분석되어야 한다. 이러한 성형특성을 바탕으로 하여 최적의 레이저 주사 속도 및 레이저 파워를 선택하여 정확한 형상의 3 차원 인공지지체를 제작할 수 있다. Fig. 4 는 레이저의 주사 속도에 따른 경화 깊이의 변화를 측정된 결과이다. 레이저의 주사 속도가 증가함에 따라 경화 깊이가 감소하는 것을 알 수 있었다.

광 조형 장치에 사용되는 고분자 재료의 경우 투과 깊이 (D_p , penetration depth) 및 임계노출 (E_c , critical exposure)은 중요한 변수이다. 합성된 TMC/TMP 의 경화깊이를 측정하여 working curve 를 얻을 수 있다. Working curve 에 의하여 얻어진 투과 깊이(D_p)는 $1349.6\mu\text{m}$ 이었으며, 임계노출(E_c)은 $35.69\text{mJ}/\text{cm}^2$ 이었다.

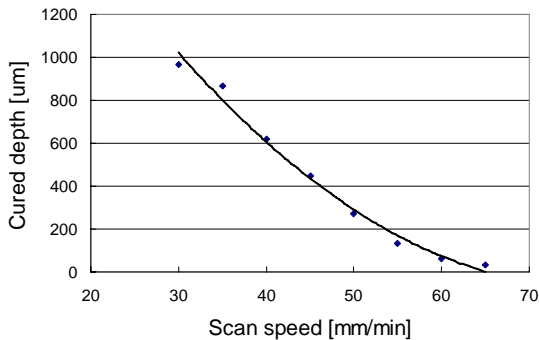


Fig. 4 Experimental result of cured depth with unfocused laser beam according to scanning speed (laser power = $400\mu\text{W}$)

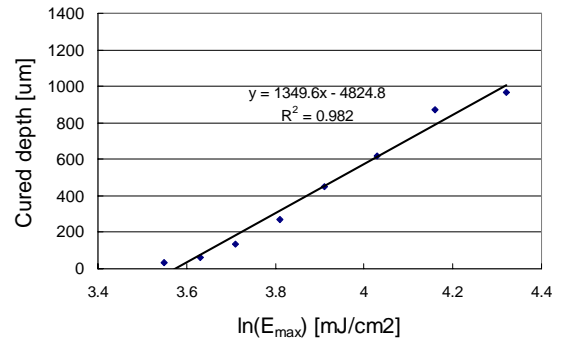


Fig. 5 Working curve of TMC/TMP polymer ($D_p = 1349.6\mu\text{m}$, $E_c = 35.69\text{mJ}/\text{cm}^2$)

4. 인공지지체 설계 및 제작

4.1 3 차원 인공지지체

3 차원 인공지지체의 pore 크기에 따른 연골세포의 생착특성을 확인하기 위해 두 종류의 인공지지체를 설계하였다. Fig. 6(a)는 동일한 pore 크기를 가지는 A 타입의 인공지지체를 나타내며, (b)는 다양한 pore 크기를 갖는 B 타입의 인공지지체를 나타낸다. Fig. 7 과 Fig. 8 은 실제 제작된 A 타입과 B 타입의 인공지지체의 SEM 사진이다.

4.2 하이브리드 인공지지체

하이브리드(hybrid) 인공지지체는 두 가지 요소로 구성되어 있다. 생분해성 생체재료로 제작된 지지체와 연골세포를 캡슐화한 알지네이트 하이드로젤(alginate hydrogel) 이다⁽⁴⁾. Framework 역할을 하는 TMC/TMP 고분자 지지체는 특정 형상으로 제작될 수 있으며, 일정한 기계적 강도를 가지고 있으므로 알지네이트 하이드로젤을 주입하였을 때 그 형상을 유지시켜줄 수 있다. 또한 생분해성 재료이므로 연골세포가 연골조직으로 재생되면서 생체 내에서 분해된다.

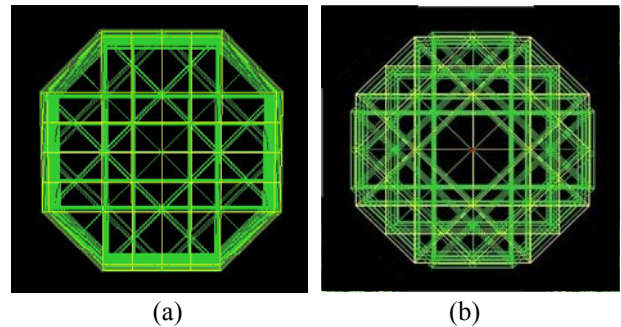


Fig. 6 Design of 3-D scaffolds: (a) type A with uniform pore size, (b) type B with various pore size

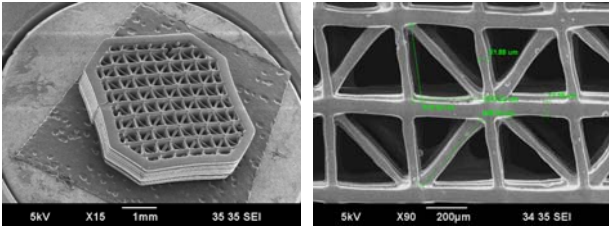


Fig. 7 SEM images of fabricated type A of scaffold (size=4.29mm×4.45mm)

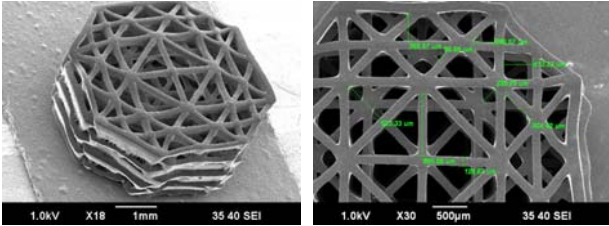


Fig. 8 SEM images of fabricated type B of scaffold (size=4.45mm×4.45mm)

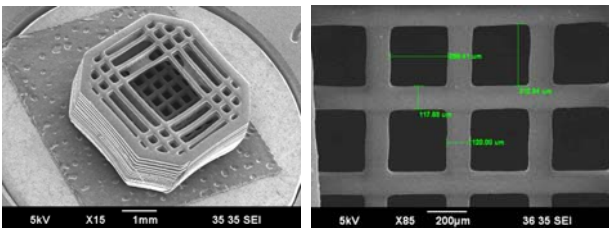


Fig. 9 SEM images of TMC/TMP framework for hybrid scaffold Hybrid scaffold was designed and manufactured by microstereolithography system

Fig. 9 는 실제 제작된 하이브리드 인공지지체의 SEM 사진이다. 하이브리드 인공지지체의 윗면과 아랫면은 그물망 구조로 되어있어 알지네이트 하이드로젤이 확산에 의한 영양분과 노폐물 교환이 이루어지도록 하였다. 알지네이트 용액을 주입하기 편리하도록 윗면 중앙에 사각형의 구멍을 제작하였다.

5. 결 과

5.1 연골세포의 분리 및 배양

3 차원 인공지지체에 연골세포를 식종하기 위하여 6 주된 New Zealand White rabbits 의 관절연골에서 연골세포를 분리하였다. 추출된 연골 조각을 PBS 로 3 회 washing 한 후 해부칼을 이용하여 최대한 잘게 잘랐다. 잘게 잘려진 연골 조직을 0.1% 콜라젠 분해 효소 (collagenase type II)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 하루 동안 분해하였다. 분해된 연골 세포는 세포분리용 체(cell strainer, Falcon, NJ, USA)를 이용하여 거른 후, 1000rpm 으로

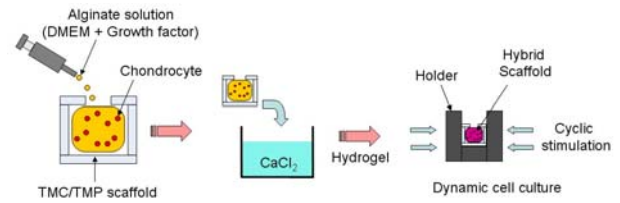


Fig. 10 Schematic diagrams showing the fabrication process of 3-D hybrid scaffold encapsulated chondrocytes

7 분간 원심 분리하여 연골세포만을 획득하였다. 분리된 연골세포는 10% 우태아혈청(FBS)이 포함된 DMEM 이 들어있는 75 cm² 세포배양 플라스크에 넣고 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

5.2 하이드로젤을 이용한 세포캡슐화

하이브리드 인공지지체를 이용하여 연골세포를 배양하기 위해서 세포를 알지네이트 하이드로젤에 캡슐화하여 인공지지체에 주입하였다. 알지네이트 젤은 세포를 보존할 수 있는 ‘세포친화적’인 pH, 삼투압, 온도 등에 있어서 적합하기 때문에 살아있는 세포에 적용하기 유리하다. Fig. 10 은 알지네이트에 연골 세포를 캡슐화시켜 하이브리드 인공지지체를 제조하는 공정을 나타낸다. 우선, 세포 서스펜션을 2% 알지네이트 용액을 적정량 부여하여 세포 농도가 2×10^6 이 되도록 하였다.

이러한 혼합용액을 TMC/TMP 로 제작된 framework 역할을 하는 인공지지체에 주입한다. 그 후에 CaCl₂ 용액을 부어주면 순간적으로 혼합용액은 인공지지체 내에서 젤을 형성한다.

5.3 조직재생평가

3 차원 인공지지체 및 하이브리드 인공지지체가 연골조직 재생에 미치는 영향을 분석하기 위해 조직학적 평가를 수행하였다. 본 분석에서는 실제로 생체 내에서 조직이 증식되어가는 양상과 세포 분포의 유무의 차이를 보고자 하였다.

Fig. 11 과 Fig.12 의 결과를 비교해 보면 A 타입에서의 연골세포 증식이 B 타입의 인공지지체 보다 매우 좋은 것을 확인할 수 있었다. 이는 B 타입의 경우 pore 의 크기가 다양한 분포를 갖고 있지만 세포의 식종 과정 중에서 많은 양의 세포가 pore 가 큰 부분에서 인공지지체 외부로 흘러나간 것으로 판단된다. 따라서, 어느 정도 작은 pore 크기를 가진 환경(약 200um 이하)에서 pore 의 크기에 대한 세포 증식에 대한 영향을 확인해 볼 필요가 있다.

Fig. 13 (a)는 동물이식 실험을 위해 하이브리드

인공지지체를 누드마우스의 피하층에 삽입하는 모습을 보여주고 있다. 이렇게 삽입된 인공지지체를 4 주 후에 채취하여 관찰하였다 (Fig. 13 (b)).

Fig. 14 는 동물 이식 후 4 주 후에 분석한 조직학적 사진이다. Fig. 14 (a)에서 볼 수 있듯이 세포 핵이 분홍색으로 염색되었으며, 알지네이트 하이드로젤 내부에 연골세포가 포집 되어 성장하고 있는 것을 알 수 있었다. Fig. 14 (b)에서도 연골소강이 생성되었으며, 내부에 핵이 진한 붉은색으로 염색된 것으로 보아 세포가 성장 하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

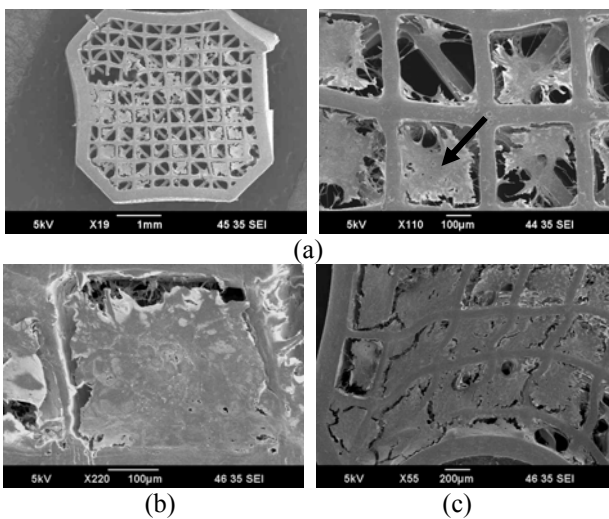


Fig. 11 SEM images of cultured chondrocytes on type A of scaffold: (a) after 3 days of seeding, (b) after 1 week of seeding, and (c) after 2 weeks of seeding

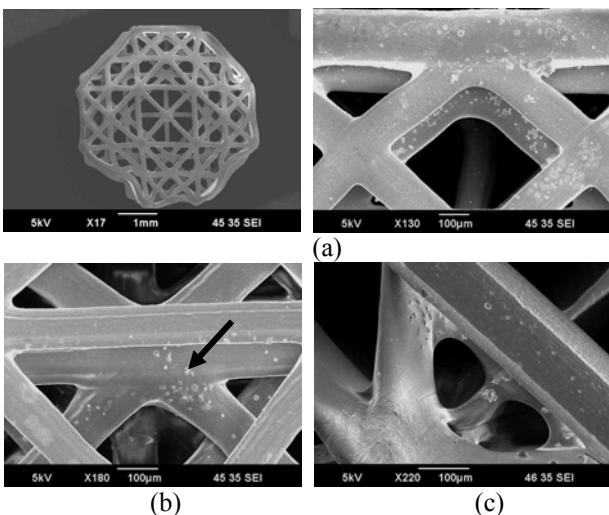


Fig. 12 SEM images of cultured chondrocyte on type B of scaffold. The arrows indicate the chondrocytes: (a) after 3 days of seeding, (b) after 1 week of seeding, and (c) after 2 weeks of seeding

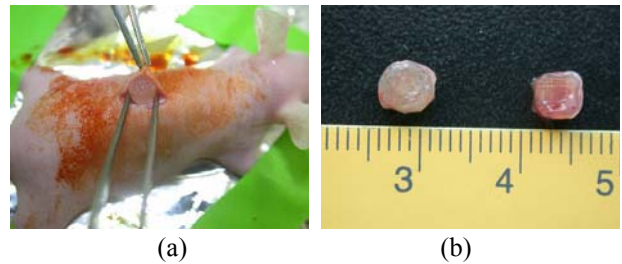


Fig. 13 *In-vivo* tissue ingrowth test, (a)implantation, (b)hybrid scaffolds after 4 weeks

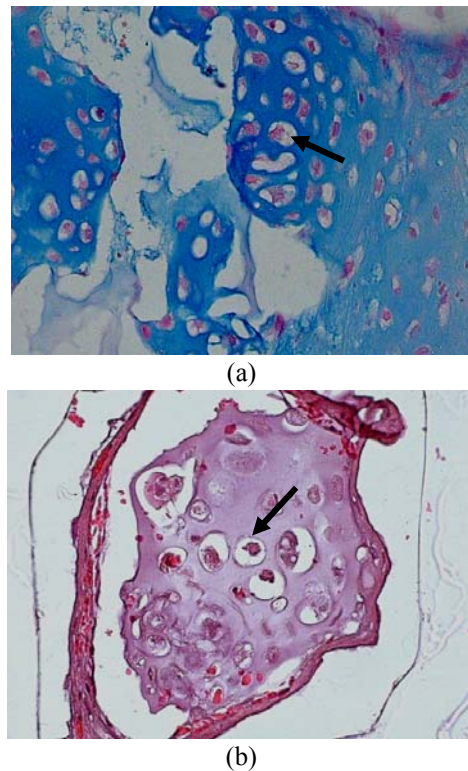


Fig. 14 Histological evaluation of chondrocytes after 4 weeks implantation, (a)Alcian blue staining image (400×), (b) H&E staining image (400×)

6. 결론

본 논문에서는 연골조직 재생을 위하여 3 차원 인공지지체를 개발하였다. 이를 위해 공리적 설계 기법을 적용한 마이크로 광 조형 시스템을 이용하여 인공지지체를 설계, 제조하였으며, UV 에 경화되면서 생체 내에서 분해되는 특성을 가진 생분해성 고분자 재료를 합성하였다. 또한 연골 세포의 생착 및 증식 특성을 비교하기 위해 두 가지 종류의 3 차원 인공지지체를 제작하였다.

3 차원 인공지지체의 경우, pore 크기에 따른 생착 특성을 비교하였으며 일정 크기 이상의 pore 를 가진 구조에서는 세포의 초기 생착률이 매우 저조한 것을 확인하였다. 즉, 세포의 증식 효과를 향상

시키려면 초기 생착률을 높여야 하며 일정크기 (약 200um) 이하의 pore 를 가진 구조에서 다양한 구조적 조건(pore 크기, 형태, 상호연결성 등)에 대한 실험이 필요하다고 판단된다.

하이브리드 인공지지체 경우에는 세포를 캡슐화시켜 주입하므로 다른 인공지지체 보다 세포의 파종 효율이 매우 높은 장점이 있다. 또한 하이드로겔의 세포외기질과 유사한 특성 때문에 연골세포의 증식에도 효과적인 것으로 보여진다. 더불어 동물 이식을 통해서 생체 내 조직 증식을 확인하였다. 하지만 이식한 연골세포의 분화나 증식 현상은 분석하기 위해서는 향후 좀 더 많은 정량화된 분석이 필요하며 기계적 자극을 줄 수 있는 바이오 리액터(bioreactor)를 이용한다면, 연골조직 재생에 큰 효과가 있을 것으로 기대한다.

후 기

본 연구는 과기부-한국과학재단 나노바이오 기술 개발사업(No. M10646020003-06N4602-00310) 의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 관계자 분들께 감사 드립니다.

참고문헌

- (1) R. P. Lanza, R. Langer, W. L. Chick, 1997, "Principles of Tissue Engineering," *Academic Press*, New York.
- (2) Lee, S.-J., Kang, H.-W., Kang, T., Kim, B., Lim, G., Rhie, J.-W., Cho, D.-W., 2007, "Development of a scaffold fabrication system using an axiomatic approach," *J. of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 17, pp.147~153.
- (3) Matsuda, T., Kwon, I.K., Kidoaki, S., 2004, "Photocurable biodegradable liquid copolymers: synthesis of acrylate-end-capped trimethylene carbonate-based prepolymers. Photocuring and hydrolysis," *Biomacromolecules*, Vol. 5, pp.295~305.
- (4) Chang, S.C.N., Rowley, J.A., Tobias, G., Genes, N.G., Roy, A.K., Mooney D.J., Vacanti, C.A., Bonassar L.J., 2001, "Injection molding of chondrocytes/alginate constructs in the shape of facial implants," *J Biomed Mater Res*, Vol. 15, No. 55, pp.503~511.