

골 조직 재생을 위한 마이크로 광 조형 기반의 인공지지체 제작 및 평가

Fabrication and estimation of scaffolds based on microstereolithography for bone tissue regeneration

*이진우¹, 강경신¹, 이승호², 김준영², 이부규², #조동우^{1,3}

*J. W. Lee¹, K. S. Kang¹, S. H. Lee², J. -Y. Kim², B. -K. Lee², #D. -W. Cho^{1,3} (dwcho@postech.ac.kr)

¹ 포항공과대학교 기계공학과, ² 울산대학교 의과대학 서울아산병원, ³ 포항공과대학교 융합생명공학과

Key words : Scaffold, microstereolithography, bone tissue regeneration, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)

1. 서론

인간 수명의 증가 및 삶의 질에 대한 욕구의 증가로 인하여 최근 이식용 장기나 조직의 수요가 증가하고 있다. 특히 교통사고 및 골다공증, 관절염 등 퇴행성 질환에 의해 발생하는 골 결손 부위에 대한 의료 수요 증가는 폭발적이다. 골 결손의 치료에 있어서, 결손부가 작을 경우 환자 자신의 뼈를 이식하여 치료할 수 있지만, 결손 범위가 광범위할 경우 환자로부터의 골 조직 수급에 한계가 있기 때문에 타인의 뼈나 이종 골이 이식되고 있다. 하지만 이 경우 자가골 이식에 비해 회복 속도가 느리며 면역 거부 반응이 발생할 확률이 높다. 따라서, 자신의 세포로부터 이식용 조직 및 장기를 재생할 수 있는 조직 공학 기술이 최근 각광받고 있다. 특히, 조직공학에 있어 세포가 부착되어 증식/분화하는 공간이며 외부의 자극으로부터 본래 형상을 유지시킴으로써 조직 재생 능력을 극대화시킬 수 있는 방안인 인공지지체 제작 기술이 주목 받고 있다.

한편 생물학 분야의 연구를 통해, 성장인자가 세포의 조직 재생 활동을 자극한다는 사실이 밝혀졌다[1-2]. 특히, 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein) 골 조직 재생에 있어 탁월한 효과를 보이고 있으며, 치과 및 정형외과 분야에서 연구되고 있다[3-4]. 하지만, 현재 연구되고 있는 골 형성 단백질의 운반/방출 시스템들은 기계적 강도가 약하기 때문에 골 조직 재생을 위한 지지체로서의 역할을 수행할 수 없는 단점이 있다.

따라서, 본 연구에서는 세포의 분화 능력을 향상시킬 수 있는 골 형성 단백질을 방출할 수 있는 3 차원 인공지지체를 개발하고자 한다. 골 형성 단백질의 방출을 위하여 서방성 방출 시스템인 미세 구체를 도입하였으며, 마이크로 광 조형 기술을 이용하여 미세 구체가 포함된 인공지지체를 제작할 것이다. 이후, 제작된 3 차원 인공지지체를 사용하여 동물 실험을 수행함으로써 생체 내에서의 골조직 재생 능력을 평가해 보고자 한다.

2. 성장 인자가 혼입된 3 차원 인공지지체의 제작

골 형성 단백질의 방출을 위하여 성장인자의 서방성 방출 시스템인 미세 구체를 사용하였으며, 재료로서는 분해 속도가 빠른 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)를 사용하였다. 미세 구체는 PLGA 를 포함한 유기용매와 poly(vinyl alcohol) (PVA)수용액의 이중에멀전에 의하여 제작하였으며, 미세 구체 내부에 골 형성 단백질인 bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)를 포함시켜 미세 구체의 분해에 따라 성장 인자의 방출이 가능하도록 설계하였다. 상세한 제작 공정을 살펴보면 먼저 0.2g 의 PLGA 를 2ml 의 dichloromethane 에 잘 용해시킨 후, 10 µg의 BMP-2 를 물에 녹여 PLGA 용액에 혼합하고 균질기를 사용하여 2 분간 교반한다. 이 공정에서 PLGA 가 녹아있는 dichloromethane 유기용매에 BMP-2 수용액이 분산되어 1 차 에멀전이 형성된다. 다음으로 1 차 에멀전을 0.5% 의 PVA 수용액에 붓고 균질기를 사용하여 8000 rpm 으로 2.5 분 동안 혼합하여 이중에멀전을 제작한다. 이중에멀전을 통해 완성된 미세 구체 수용액은 isopropyl

alcohol (IPA) 수용액에서 3 시간 동안 교반하여 유기 용매인 dichloromethane 을 증발시킨다. 이후 IPA 수용액을 원심 분리하여 수용액으로부터 미세 구체를 분리해 낸 후 동결 건조하여 -20°C 의 온도에서 보관한다. Fig. 1 은 완성된 미세 구체를 보여주고 있다.

마이크로 광 조형 기술은 수 마이크로 미터의 지름으로 초점된 UV 레이저를 액상의 수지 표면에 조사함으로써, 광경화 반응을 일으켜 단면을 성형한 후 각각의 단면을 적층하여 복잡한 3 차원 형상을 제작하게 된다. 성장인자가 함유된 3 차원 인공지지체를 제작하기 위해서는, 먼저 광 조형이 가능한 액상의 생체 재료인 poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate (PPF/DEF)를 준비하고 준비된 PPF/DEF 무게의 1% 양의 미세 구체를 PPF/DEF 에 투입하여 혼합액을 잘 섞어준다. 이후 UV 레이저를 혼합액에 조사하여 단면패턴을 형성시킨 후 적층함으로써, 3 차원 형상의 인공지지체를 제작하였다. 또한 3 차원 인공지지체는 프로그램 상에서 설계된 것처럼 각층이 엇갈리게 정렬되어 제작되었다. 광 조형 장치를 사용하여 지지체 제작을 완료한 후, 초음파 세척기를 사용하여 지지체 내부에 남아 있는 미 경화된 광경화성 수지를 제거하였다. Fig. 2 에서 볼 수 있는 것처럼, 제작된 지지체는 원래 설계된 형상대로 잘 제작되었으며, 지지체의 표면 및 수직면에서 미세 구체가 그 형상을 잘 유지하면서 혼입되어 있었다. 이 결과로부터 본 연구에서 제안된 성장 인자가 포함된 인공지지체의 제작이 성공적으로 이루어 졌음을 확인할 수 있었다.

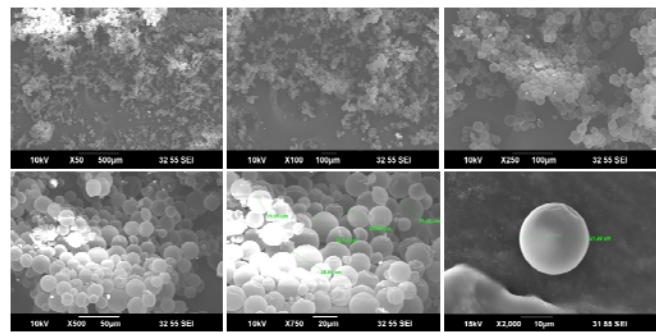


Fig. 1 Microspheres produced by double emulsion solvent evaporation/extraction method

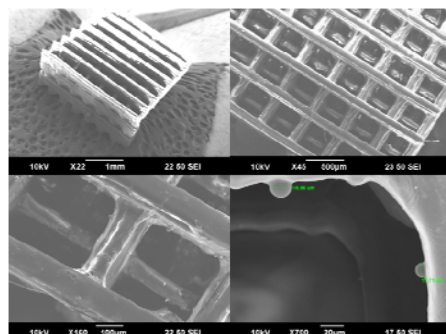


Fig. 2 Fabrication results of growth factor-loaded 3D scaffolds

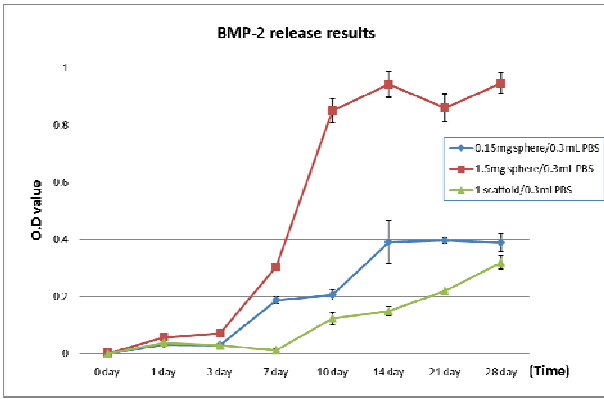


Fig. 3 Comparison of BMP-2 release from microspheres and from 3D scaffolds

3.3 3차원 인공지지체에서의 BMP-2 방출 측정

미세 구체에서의 시간에 따른 BMP-2 방출 양상을 관찰하기 위하여 제작된 인공지지체를 식염수가 든 용기에 넣어 37°C 인큐베이터에 보관한 후, 시간의 진행에 따른 BMP-2의 방출량을 살펴 보았다. 지지체 내부의 공극 사이의 식염수 유동을 발생시키기 위하여 식염수 용기를 흔들어 줄 수 있는 교반기를 인큐베이터 내부에 설치하고 실험 기간 동안 계속 작동시켰으며, 실험 개시 후 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28 일에 용기로부터 성장 인자가 방출된 식염수를 채취하여 방출량을 측정하였다. 그리고 단백질의 항원-항체 반응을 이용하여 식염수에 함유된 BMP-2를 정량화하였다. 미세 구체가 단독으로 존재할 경우에는 실험 후 3일 뒤에 방출이 시작되었고, 14일째에는 방출이 완료되었다. 반면 미세 구체가 포함된 지지체에서는 7일째까지 방출이 시작되지 않았으며, 그 이후 방출이 시작되어 최대 4주째까지 방출이 진행되었다. 또한 Fig. 3의 분석된 BMP-2 방출 양상 그래프에서 볼 수 있는 것처럼, 방출 시작 이후에는 시간이 흐름에 따라 고르게 방출되고 있음을 확인하였다. 이 결과로 볼 때 성장 인자를 방출하는 본 지지체는 장기간의 약물 방출에 있어서도 기존의 미세 구체보다 우수함을 보여 주었다.

4.3 3차원 인공지지체의 골 조직 형성 평가

성장인자인 BMP-2가 포함된 3차원 인공지지체의 골 재생 능력을 평가하기 위하여 동물 실험을 수행하였다. 실험 동물로는 생후 12주된 350~400g의 Wistar rat을 사용하였다. 쥐의 두개골에서 수술용 드릴을 이용하여 자연치유가 힘든 크기(지름 8mm)의 골 조직을 절제한 후, 제작된 인공지지체를 이식함으로써 인공지지체에 의한 골조직 형성 과정을 살펴 보았으며, 절제 부위에 아무것도 이식하지 않은 쥐와 BMP-2가 포함되지 않은 인공지지체를 삽입한 쥐를 대조군으로 삼았다. 수술 4주 후 쥐를 희생시켜 micro-CT를 통해 골 형성 면적을 분석해 본 결과, BMP-2가 포함된 지지체를 이식한 실험체의 경우 절제 부위의 37.5% 면적에서 새로운 골조직이 형성되었다. 수술 11주 후, 대조군에서는 골 형성 면적이 단지 10% 였으나, 인공지지체를 삽입한 실험체의 경우 39%, BMP-2가 포함된 지지체를 이식한 실험체의 경우 전체의 85%의 면적에서 골조직이 형성되었다. Fig. 4는 골 재생 양상을 보여주는 micro-CT 영상이다. Fig. 5에서 볼 수 있는 것처럼, 조직학적 분석 결과 역시 micro-CT에 의하여 분석된 결과와 마찬가지로 BMP-2가 포함된 지지체를 이식한 쥐의 경우가 두개골 형성에 있어 압도적으로 우위에 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 개발된 BMP-2 방출이 가능한 지지체는 골 조직 재생을 위한 좋은 후보가 될 것으로 기대된다.

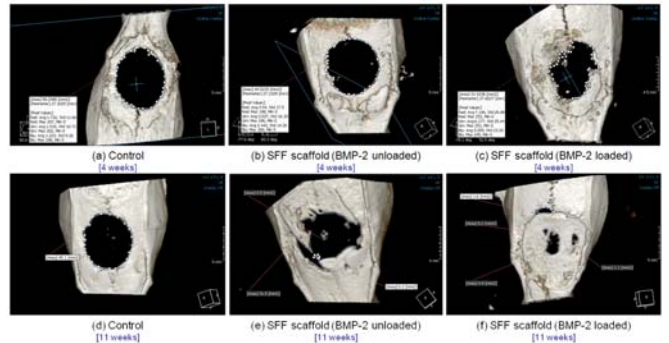


Fig. 4 Micro-CT images of rat cranial bone

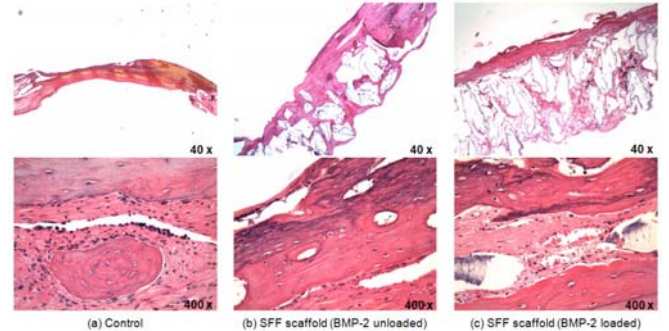


Fig. 5 Hematoxylin & Eosin images of implanted scaffolds (11 weeks after implantation)

5. 결론

본 연구에서는 세포의 분화 능력을 향상시키기 위하여 골 형성 단백질인 BMP-2를 방출하는 3차원 인공지지체를 개발하였다. 미세 구체를 지지체에 포함시킴으로써 BMP-2가 오랜 시간 동안 방출이 가능하도록 하였으며, 항원-항체 반응을 통해서 방출 양상을 확인하였다. 또한 개발된 인공지지체에 대한 동물 실험을 수행함으로써 지지체의 골 조직 재생 능력을 관찰하였다. 쥐의 두개골을 절제하여 BMP-2가 포함된 지지체와 포함되지 않은 지지체를 이식하고 micro-CT 및 조직 시편을 이용하여 시간에 따른 골 형성 양을 분석한 결과, BMP-2가 포함된 인공지지체의 경우 골 형성 능력이 탁월함을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 골 조직 재생을 위한 인공지지체의 설계 및 제작에 있어 토대가 될 수 있을 것으로 기대된다.

후기

이 연구는 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행한 연구(No. R0A-2005-000-10042-0 & No. M10646020003-08N4602-00310)이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Tabata Y., "Tissue regeneration based on growth factor release," *Tissue Engineering*, **9** (Suppl 1), S5-S15, 2003.
2. Arm D.M., Tencer A.F., Bain S.D., Celino D., "Effect of controlled release of platelet derived growth factor from a porous hydroxyapatite implant on bone in growth," *Biomaterials*, **17**(7), 703-709, 1996.
3. Heckman J.D., Boyan B.D., Aufdemorte T.B., Abbott J.T., "The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model," *J. Bone Joint Surg Am*, **73**(5):750-764, 1991.
4. Reddi, A.H., "Role of Morphogenetic Proteins in Skeletal Tissue Engineering and Regeneration," *Nat. Biotechnol.*, **16**, pp. 247-252. 1998.