creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

치의과학석사 학위논문

사람 연골세포 기반 인공물질 미개입 티슈모듈 형성

2017년 8월

서울대학교 대학원

치의과학과 치의재생생명공학전공

이 송 이

요약(국문초록)

사람 연골세포 기반 인공물질 미개입 티슈모듈 형성

이 송 이
서울대학교 대학원
치의과학과 치의재생생명공학 전공
(지도교수 조 재 진)

1. 목 적

현재까지 골관절염 혹은 턱관절장애와 같은 만성질환의 원인 치료에 관해 적절한 방법이 없는 실정이며, 자가연골세포 및 줄기세포치료제는 병변의 근원적 회복에는 한계가 있다. 이에 대한 대안으로, 최근 줄기세포 등을 기반으로 거대 조직체를 생산하는 시도가 주목 받고 있다. 조직체를 생산하기 위하여 지지체 등 인골물질개입을 이용한 시도가 주를 이루나, 최근 인공적 지지체 개입 없이 조직체를 형성하는 기술이 소개되고 있다. 본 연구에서는 사람 연골조직에서 분리한 연골세포를 이용하여 수십 ~ 수백 μm 크기의 마이크로블럭 (microblock, MB)인 세포 덩어리를 만들어내었고, 이를 재배열하여 3 ~ 4 mm 단위의 지지체 미개입 연골조직체인 티슈모듈 (tissue module, TM) 생산기술 개발을 연구목표로 하였다.

2. 방 법

사람 연골초대배양세포는 유세포분석기 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)를 이용한 특성 분석 및 성장곡선 (growth curve)과 배가시간 (Population doubling time, PDT)을 측정하였다. 물리적 힘을 이용해 수십 ~ 수백 μm 크기의 MB를 생산하고, 이미 계산되어진 물리적 환경을 기준으로 3 ~ 4 mm 크기의 TM을 형성하였다. 이를 위해 다음과 같이 시험계를 구성하였다. : 대조군, 연골초대배양세포; group 1, 3일 MB; group 2, MB 3일 + TM 1일; group 3, MB 3일 + TM

3일; group 4, MB 7일 + TM 3일; group 5, MB 14일 + TM 3일

생산된 TM은 연골로의 분화를 위해 TGF-β3를 처리하였다. 연골분화능을 증명하기 위해 glycosaminoglycan (GAG) 분석, hematoxylin-eosin (H&E) 염색, masson's trichrome (MT) 염색 및 면역화학염색 (콜라겐Ⅰ, 콜라겐Ⅱ)을 실시하였다. SPSS Statistics 23.0 software를 이용하여 통계 분석하였다.

3. 결 과

본 연구에서는 6계대 연골세포를 사용하였으며, 이들은 2계대 연골세포들과 유사한 형태를 유지하였고, 증식능도 유사하게 유지되었다. 연골세포의 FACS 결과 줄기세포 표면항원의 발현이 CD73을 제외하고는 95% 이상 높은 결과치를 얻었으며, hematopoietic cell marker에 대해서는 거의 발현되지 않았다. TM의 형태분석을 위한 shape factor 측정 결과, circularity 및 roundness 값의 변화가 group 3 (3+3)보다 group 4 (7+3)에서 더 낮게 측정되었다. 연골 분화 지표인 GAG 절대 함량은 MB 배양 기간이 길어짐에 따라 줄어드는 경향성을 보여 MB 배양을 14일간 했던 group 5 (14+3)에서 가장 값이 낮고, 전체 그룹의 GAG 정량값은 연골세포와 유사한 수치를 나타내었다. H&E 염색, MT 염색 결과, 다량의 세포 외 기질이 관찰되었으며, 콜라겐 Ⅱ는 전체 그룹에서 유사하게 유지되는 것을 확인하였다.

본 연구는 연골초대배양세포로부터 3-4 mm 크기의 TM 생산기술을 확보하여, 향후 턱관절장애나 골관절염의 기존 치료법의 한계를 극복할 수 있는 플랫폼을 제시한다.

주요어 : 연골초대배양세포, 삼차원 구성, 인공물질 미개입, 마이크로블럭, 티슈모듈, 연골조직, 조직 공학

학 번 : 2015-23265

목 차

서론 ····· 4

재료 및 방법 ····· 6

결과 ····· 10

고찰 ····· 13

참고문헌 ····· 17

결과사진 ····· 24

초록(영문) ····· 30

서 론

관절연골은 얇은 두께에도 불구하고 높은 강도를 유지하고, 압박에 의한 하중을 분산하여 큰 내구성을 유지하며 정상적인 기능을 한다 [1]. 연골은 GAG, 콜라겐 Ⅱ, aggrecan을 주로 포함하는 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM)과 연골 특이적 세포인 연골세포로 구성되어 있으며, 연골세포는 연골기질의 생성과 분해에 중요한 역할을 한다 [2]. 그러나 관절연골에는 혈관과 림프관이 분포되어 있지 않아서 스스로 재생되는 능력이 제한적이라는 특징이 있다 [1, 2]. 이러한 관절연골의 분해가 생성보다 더 빨리 진행될 때 나타나는 질병으로 골관절염 및 턱관절장애 등이 알려져 있다. 관절연골의 소실로 인하여 주변의 뼈와 인대 등의 손상으로 인하여 염증을 동반한 반복적인 통증과 비정상적인 관절의 움직임 등의 증상이 나타난다 [3, 4, 5]. 이러한 골관절염 혹은 턱관절장애 등의 만성질환은 원인 치료에 관해 적절한 방법이 없는 실정이며, 성인 관절연골은 스스로 재생하는 능력에 제한이 있어 세포를 기반으로 한 치료의 발전을 필요로 한다 [6, 7, 8, 9]. 세포를 기반으로 한 치료법과 연골 조직 공학의 발전은 관절염이나 턱관절 장애와 같은 관절 결손 부위에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 예상된다.

자가 연골세포 이식법은 기존의 세포 기반 치료법으로 사용되어 왔으나 복잡한 시술과정이나 긴 회복기간 등의 단점뿐만 아니라 손상부위의 회복을 담보하지 못한다는 단점이 있다 [10, 11, 12]. 세포 치료를 위한 세포가 대량으로 필요한데, 이차원 세포 배양 시스템은 세포들이 성장하는 실제 미세 환경과 상당한 차이가 있다 [13]. 세포 치료 시 필요한 많은 양의 세포를 얻기 위해 배양시간이 길어지고, 이를 위한 계대배양을 많이 할수록 연골세포는 고유한 분자적 특징을 잃게 된다. 이차원으로 배양된 연골세포는 GAG, 콜라겐 Ⅱ와 같은 세포 외 기질의 발현이 낮고 섬유세포적인 특징이 증가한다 [11, 14].

이러한 이차원 세포 배양법의 한계점을 극복하기 위하여 생체와 유사한 삼차원 조직체 형성 기술에 관한 많은 연구들이 시도되어왔다. 삼차원 조직체를 형성하기 위한 삼차원 세포 배양 시스템은 세포들이 입체적인 구조를 형성하며 조직 유사체를 형성하는데 유리하다. 지지체를 이용, 그 안에 세포들을 삽입하여 구조체를 만드는 시도와 [15, 16, 17, 18] 물리적 힘을 적용 [19, 20, 14, 21, 22], 혹은 제한된 공간

을 가지는 틀을 이용하여 [23, 24] 세포 유래 조직체를 만드는 시도가 소개되고 있다. 지지체를 이용한 연골세포 이식방법은 물리적 안정성을 제공하고 연골화에 도움을 준다 [25, 26]. 그러나 이러한 시도들은 지지체의 생체적합성이 제한적이고 부산물이 생성되는 등의 부작용을 나타낼 수 있어, 이러한 한계를 극복하는 것이 당면 과제이다.

지지체는 세포들 사이의 신호전달과 응력을 방해하기 때문에 조직체에 적용하였을 경우 생체적합성이 낮다는 단점이 있다. 반면에 지지체 미개입 구조체는 새로 형성되는 조직의 세포와 세포 외 기질 사이 상호작용이 더 용이하게 일어나 생체조직을 더욱 잘 모사할 수 있다 [10, 13]. 기존의 지지체 미개입 조직체의 경우 이차원 배양 방법보다는 콜라겐이 풍부한 세포 외 기질이 형성되지만, 주변부에 비하여 중심부의 프로테오글리칸 함량이 적고 산소와 영양공급이 이루어지는데 한계가 있다 [11, 19].

본 연구에서 제시하는 지지체 미개입 연골 조직체 제작기술은 연골과 유사한 충분한 세포 외 기질 형성이 가능한 수 mm 크기의 재생조직을 시험관 내에서 제작하여, 결손부위에 이식하는 시스템이다. 기존의 이차원 세포 배양과 본 연구의 지지체 미개입 삼차원 구조체는 여러 차이점을 예상 할 수 있다. 예를 들어 세포와 세포, 세포와 기질 사이의 상호작용이 다를 것으로 예상된다.

이러한 문제점들을 극복하기 위하여, 본 연구는 연골세포를 이용하여 수십 ~ 수백 μm인 다양한 크기의 세포 덩어리를 물리적 힘을 이용하여 제작하였고, 이를 마이크로블럭 (microblock, MB)이라 명명하였다. 이전 연구의 계산된 값을 바탕으로 MB를 재배열하여 3-4mm 크기의 티슈모듈 (tissue module, TM)을 형성하였다. 시험관 내에서 큰 조직체를 만들게 되면 영양분 및 산소 공급이 원활하지 못하여 심부의 변형과 괴사가 유발된다 [27]. 그러나 본 연구에서는 거대 TM의 기본단위인 다양한 크기의 MB를 형성하였다. 이를 제한된 공간에 재배열하여 거대 TM을 제작하는데, 완성된 TM의 독특한 형태로 인해 심부의 변형이나 괴사를 최소화 할 수 있다. 연골세포기반 스캐폴드 등 인공물질이 미개입된 TM의 연골 모사성을 분석하여, 연골 모사체 제작 기술을 확립하였으며 이는 기존의 골관절염 및 턱관절장애 치료의 한계를 임상적으로 극복 가능한 치료 플랫폼이 될 것으로 기대 된다.

재료 및 방법

사람 유래 연골세포의 준비

사람 연골세포는 본 연구실에서 보관하고 있던 초기 계대 세포를 사용하였다. 질소탱크에 동결되어 있던 초기 계대 연골세포를 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT, USA)과 1% antibiotic-antimycotic solution (Gibco, Grand Island, NY, USA)를 포함하는 DMEM (Welgene, Deagu, Korea)에 넣고 4°C에서 400 × g로 원심분리하고 pellet을 동일한 배지에 희석하여 37°C, 5% CO_2 환경의 배양기에서 배양하였다. 6 계대 연골세포를 실험에 사용하였다.

Growth curve와 Population doubling time (PDT) 측정

6 계대 연골세포의 growth curve와 PDT를 측정하였다.

계산공식

Growth curve = $logNn*logNn_{-1}/logN_0$

PDT = $T/\{(logNn-logN_0)/log2\}$

(T : 세포 배양 기간, $logNn_{-1}$: n-1 계대에서 배양된 세포의 수, logNn : n 계대에서 배양된 세포의 수, $logN_0$: 초기 세포의 수)

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 분석

사람 연골초대배양세포의 특성분석을 위하여 표면항원 분석을 FACS 법으로 분석하였으며, 아래와 같은 항체들이 사용하였다. ; FITC-conjugated mouse anti-human CD14, CD31, CD44 and CD45; PE-conjugated mouse anti-human CD29, CD73, and CD117; PE.Cy5-conjugated mouse anti-human CD90; APC-conjugated mouse anti-human CD34 and HLA-DR; streptavidin-conjuaged PE; biotin-conjuaged HLA class I (BD PharMingen, San Diego, CA, USA); APC-conjugated mouse anti-human CD105 (eBioscience, San Diego, CA, USA). 약 십만 개의 연골세포를 4% Paraformaldehyde에 10분간 고정 후 FACS buffer (2% FBS를 포함한 DPBS)로 세척하였다. 이후 각 항체를 30분간 얼음에 두었다.

FACS buffer로 세척 후, FACS CaliburTM (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA)으로 형광 강도를 측정하고 BD CellQuest Pro software (Becton Dickinson)로 정량하였다.

사람 연골세포유래 MB 형성

MB는 세포를 응집한 구 형태의 세포덩어리로 aggregate, sphere, pellet등으로도 불리운다. 사람 연골세포유래 MB를 형성하기 위하여, 0.25% trypsin을 처리하고 세포들을 모았다. DMEM과 50 μg/mL ascorbate-2-phosphate, 100 μg/mL sodium pyruvate, 40 μg/mL L-proline, 1% ITS+Premix, 10 ng/mL TGF-β3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 포함하는 연골화 배지를 사용하였다. Round-bottom 96-well plates (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA)에 well 당 1.2×10^4 cells을 분주하고 500 × g에서 5분간 원심분리 하였다. MB는 37°C, 5% CO_2 incubator 배양기에서 배양하였으며 3일, 7일, 14일간 배양 후 형성된 MB는 TM 제작에 사용하였다 (Fig 1.).

TM 형성 및 Macroscopic 분석

이전 연구에서 계산된 값을 바탕으로, 다양한 크기로 형성된 MB는 non-coating 96-well plate (SPL, Daejeon, Korea)에 재배열하여 TM 형성이 가능하도록 하였다. 각 well 당 200 μL의 배지를 넣고 배양하였다 (1일, 3일). 사람 연골세포유래 MB, TM은 stereoscope (SMZ645; Nikon, Tokyo, Japan)으로 macroscopic 분석을 하였다. MB는 1일 간격으로 3일 동안 촬영을 하였으며, TM은 12시간 간격으로 3일 동안 촬영하였다 (Fig 3.). 크기 분석을 위해 사진 촬영 후 micro-ruler를 이용해 그 크기를 측정하였다.

TM의 Shape factors (circularity and roundness) 측정

Circularity는 원의 장축과 단축의 대칭성을 나타내며 roundness는 도형면의 모양이 얼마나 원에 가까운지 나타내는 지표이다. Circularity와 roundness는 12시간 간격으로 3일 동안 ImageJ program을 사용하여 측정하였다.

계산공식

Circularity = $4*\Pi*A$ / ([Perimeter]^2)

Roundness = $4*\Pi*A$ / ([Π*major axis]^2)

Circularity와 roundness는 대상의 형태가 얼마나 원에 가까운 지를 나타내는 지표이다. 이상적인 원의 circularity와 roundness의 값은 1이다. 형태가 원에 가까울수록 값은 1에 수렴한다.

Glycosaminoglycan (GAG) 함량 분석

GAG 함량을 측정하기 위하여, Blyscan Sulfate Glycosaminoglycan Assay (Biocolor Ltd, Belfast, Ireland) kit를 사용하였다. 샘플들은 1 mL Papain buffer (0.2 M sodium phosphate buffer, 0.1 M sodium acetate, 10 nM ethylene diamine tetraacetin acid (EDTA), 5 mM L-cysteine and HCl, pH 6.4)에 7.8 μL papain과 함께 18시간 65℃에 두었다. 그리고 10,000 × g에 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 kit 용액과 반응시켜 ELISA reader (S500; BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 656 nm에서 흡광도를 측정하였다. Chondroitin-4-sulfate solution을 standard로 사용하였다. 또한 세포의 DNA 함량을 측정하기 위하여 pico-green dsDNA assay kit (Invitrogen, Camarillo, CA, USA)를 사용하였다. 전체 GAG 함량과 DNA 함량을 그래프로 나타내었고 전체 GAG 함량은 전체 DNA 함량으로 나누어 정량하였다.

조직학 분석을 위한 특수염색 및 면역화학염색

4% Paraformaldehyde에 고정시킨 표본은 탈수, 투명, 파라핀 침투 과정을 거쳐서 조직 포매를 하였다. 포매한 표본은 4 μm 두께로 절단하여 슬라이드를 제작하였다. 절단된 슬라이드는 Histo-clear II (Natural Diagnostics, Blackburg, VA, USA)로 탈파라핀 후 알콜로 수화하였다. 세포의 형태를 관찰하기 위하여 표본을 haematoxylin and eosin (H&E) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 염색을 하였다. MB와 TM의 콜라겐을 확인하기 위하여 masson's trichrome 염색 (MT)을 진행하였다. MT 염색은 세가지 염료로 근육, 아교섬유, 섬유소 및 적혈구를 선택적으로 염색하는 방법으로, Trichrome III Blue Staining Kit (Roche,

Lilleroe, Denmark)를 사용하였다. 면역화학염색에는 the avidin-biotin-peroxidase complex principle (R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 사용하였다. 슬라이드는 탈파라핀 및 재수 과정을 진행하였고 peroxidase와 pepsin을 각각 10분간 처리하였다. 1차 항체는 4℃에서 하루 배양 하였고 kit의 발색용액을 사용하였다. 1차 항체는 anti-collagen Ⅰ (1:100; Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-collagen Ⅱ (1:5, Abcam, Cambridge, MA, USA)를 사용하였으며 Heamatoxylin으로 대조염색을 하였다.

Statistical analysis

실험은 세 번 반복하여 평균값 ± 표준편차 (mean ± S.D)로 나타내었다. student's t-test로 통계 분석을 하였고 프로그램은 SPSS Statistics 23.0 software를 사용하였다. *p*-value가 0.05 이하일 때 유의적 차이가 있는 것으로 나타내었다.

결 과

사람연골초대배양세포 특성 분석

사람 연골초대배양세포는 6계대까지 배양하여 실험하였다. 2계대, 6계대 연골세포는 현미경 사진에서 돌출부가 있는 다각형 모양이 관찰되었다 (Fig 2. A, D). 2계대 배양에서 6계대 배양을 했을 때 총 세포의 수가 약 1,000배 이상 차이가 나는 것을 growth curve를 통해 확인하였다. 또한 2계대, 6계대 연골세포의 PDT는 큰 차이가 없었다 (Fig 2. B). 사람 연골초대배양세포는 줄기세포와 연골세포의 표면 지표 확인을 위하여 FACS 분석을 하였다. 사람 연골초대배양세포는 CD73을 제외한 모든 줄기세포의 양성 지표에서 95% 이상의 발현 정도를 보였고, 줄기세포 음성 지표는 모두 1% 이하의 발현 정도를 보였다 (Fig 2. C). 또한 6계대에서도 사람 연골초대배양세포의 콜라겐 Ⅱ 양성 반응이 유지됨을 확인하였다 (Fig 2. D).

MB와 TM 형성

MB를 형성하는 과정에서, 원심분리 직후 96-well의 가운데에 연골세포들이 모여 있는 것이 관찰되었다. MB 배양 1일 후, 세포들이 서로 뭉쳐서 활모양의 덩어리를 형성하였다. MB 배양 2일 후부터 구형의 세포 덩어리가 형성되는 것을 확인하였고, MB 배양 3일째에는 완전한 구형이 완성되었다 (Fig 3. A). TM 형성을 위하여 기존의 계산된 값을 바탕으로 직경 약 6.4 mm의 제한된 공간에 다양한 크기의 MB를 재배열 하였다. TM 배양 12시간 후, MB의 가장자리가 가운데로 모이면서 하나의 덩어리로 형태를 이루었다. TM 배양 24시간 후, MB들은 서로 강하게 접착하여 전체적인 형태가 더욱 압축되었고, 48시간 후 TM의 가장자리가 바닥면에서 위쪽으로 올라가는 현상이 관찰되었다. TM 배양 72시간이 되었을 때, 가장자리가 TM의 중심방향으로 모아져 가운데 빈 공간을 만들면서 TM을 형성하였다 (Fig 3. B).

TM의 circularity와 roundness

Circularity는 원의 장축과 단축의 대칭성을 나타내며 roundness는 도형면의 모양이 얼마나 원에 가까운지 나타내는 지표이다. TM의 형태가 얼마나 원에 가까운 지 분석하기 위한 지표로 group 3 (3+3)과 group 4 (7+3) TM의 circularity와 roundness를 분석하였다. Fig 4. A, C, E와 G는 개별 TM의 circularity와 roundness의 시간대별 변화이며, Fig 4. B, D, F와 H는 이들의 평균치를 나타낸 그래프이다. group 3 (3+3)에서 TM 배양 24시간 후, circularity가 가장 낮고 72시간까지 점차 증가하였다 (Fig 4. B). 반면에 group 4 (7+3)에서는 48시간 까지 circularity가 감소하였다가 그 이후 다시 증가하는 것을 확인할 수 있다 (Fig 4. F). Roundness의 경우 group 3 (3+3), group 4 (7+3)모두 시간에 따라 점차 감소하는 유사한 경향성을 나타냈다 (Fig 4. D, H).

MB와 TM의 GAG 함량 분석

각 그룹의 GAG 함량 차이를 비교하기 위해 사람 연골초대배양세포와 MB, TM 내 GAG 함량을 측정하였다. GAG/DNA는 GAG 절대 함량을 DNA 절대 함량으로 나누어 정량한 값을 나타낸다. 전체 그룹에서 연골세포와 유사하거나 높은 함량을 나타내었다 (Fig 5. A). GAG 절대 함량의 경우, group 4 (7+3)와 group 5 (14+3)에서 급격하게 감소하였고, 연골세포보다 각각 1.76배, 4.54배 낮게 측정되었다. group 1 (MB)은 가장 많은 GAG 함량이 측정되었으며, group 5 (14+3)에 비해 8.11배 높게 나타났다 (Fig 5. B). 또한 group 4 (7+3)와 group 5 (14+3)의 DNA 함량이 다른 그룹에 비해 매우 낮게 측정되었기 때문에 GAG/DNA 값의 경우 다른 그룹과 유사하거나 높게 나타났다 (Fig 5. A, C). MB 배양 시간이 7일 이상 길어지면 GAG와 DNA 함량이 감소하였다 (Fig 5. B, C). 반면에 group 1 (MB), group 2 (3+1), group 3 (3+3)의 GAG와 DNA 절대 함량은 사람 연골초대배양세포와 유사하거나 더 높았다. 특히 GAG 절대 함량은 연골세포에 비하여 각각 1.78배, 1.64배, 1.28배 높게 측정되었다. (Fig 5. B, C).

조직학 분석, 특수염색 및 면역화학염색

MB와 TM의 조직학적 분석 및 콜라겐 등 세포 외 기질 발현을 확인하기 위해 H&E 염색, MT 염색, 콜라겐 Ⅰ및 콜라겐 Ⅱ 면역화학염색을 실시하였다 (Fig 6). H&E 염색에서는 전체 그룹에서 약간의 괴사와 세포분열이 관찰되었으며 특히 큰 size의 MB 중심부 쪽에서 많이 관찰되었다. MT 염색에서 MB보다 TM에서 더 강하게 염색되어 콜라겐 함량이 더 많은 것으로 예상된다. group 4 (7+3)와 group 5 (14+3)에서는 세포 내에 콜라겐 기질이 특이적으로 관찰되었다. 콜라겐 Ⅰ의 경우 group 4 (7+3)에 비교적 강한 발현을 보였지만 다른 그룹들과 큰 차이는 보이지 않았으며 콜라겐 Ⅱ 역시 그룹 간 발현정도의 큰 차이는 관찰되지 않았다. 콜라겐 Ⅰ과 콜라겐 Ⅱ 의 그룹 간 발현 정도의 차이는 관찰되지 않았음에도 불구하고 연골세포와 유사한 발현을 나타냈다.

고 찰

본 연구는 사람 연골초대배양세포를 이용하여 수십 ~ 수백 μm 크기의 작은 구형 MB를 제작하고, 수학적 계산을 바탕으로 산소 및 영양분 공급이 용이한 구조를 가진 3 ~ 4 mm 크기의 연골 모사체인 TM을 생산하는 기술을 확립하고, 이의 연골 모사정도를 분석하여, 골관절염 및 턱관절장애 재생치료의 플랫폼으로써 가능성을 제시하였다.

최근 관절질환을 타켓으로 한 여러 연구들이 많이 진행되고 있으며, 그 중 ㈜코오롱생명과학에서 골관절염 치료제 (인보사®)를 개발하여 국내 시판되었다. 인보사®는 세포를 기반으로 하는 치료제로, 일반 연골세포와 TGF-β1 유전자 도입 연골세포를 손상된 관절에 주입하는 방법으로 골관절염 치료에 적용된다. 그러나 인보사®는 연골재생을 통한 구조개선이 아닌 단순히 장기간 통증완화의 효과만을 보였으며, 이는 관절질환 치료의 근본적인 한계점을 극복하지 못하였다 [28, 29]. 반면 본 연구에서는 근본적인 연골 구조의 개선을 목표로 하여, 거대 연골 모사체를 개발하였으며 이는 질환부위에 이식 시 원활한 연골의 재생이 가능하다.

본 연구에 사용된 사람연골초대배양세포는 형태분석 및 FACS 분석, 콜라겐 함량 등을 통해 연골세포임을 확인하였다 (Fig 2). 또한 기존의 연골 세포 관련 유사 연구들의 경우 2 ~ 3 계대 세포를 사용하였으나 [20, 30, 31], 본 연구는 실험에 사용 가능한 충분한 양의 세포를 확보하기 위하여 연골세포를 6계대까지 배양하여 사용하였다. 연골세포의 형태는 6계대에서도 역시 다각형 모양으로 관찰되었고 또한 PDT와 증식비율이 6계대 배양에서도 유지되는 것이 확인되었다. FACS 분석에서는 줄기세포와 연골세포 양성 지표의 대부분에서 높은 발현양이 확인되었으며, 콜라겐 Ⅱ의 발현 역시 면역화학염색을 통해 확인하였다. 이는 6계대 배양을 하였음에도 불구하고 연골세포의 고유한 특성이 유지되는 것을 증명한다.

연골 모사체를 형성하는 방법으로 지지체를 개입한 삼차원 조직체 배양법을 적용할 수 있다. 지지체를 이용하여 연골세포를 이식하는 방법은 안정적인 형태를 유지하는데 유리하지만 지지체의 생체적합성이 낮으며 부산물이 생성되는 등의 부작용이 있다 [25, 26]. 이러한 부작용을 개선하기 위한 방법으로 지지체 미개입 삼차원 조직체 배양법이 있다. 기존의 지지체 미개입 삼차원 조직체 배양법에서는

이차원 배양 방법에 비해 콜라겐과 같은 세포 외 기질이 풍부하게 생성되는 이점에도 불구하고 주변부와 비교했을 때 중심부의 프로테오글리칸 함량이 적고 산소와 영양공급이 이루어지는데 한계가 있어 세포변형 및 괴사가 발생할 수 있다 [11, 19, 32, 33]. 따라서 본 연구에서는 기존 연구들보다 적은 수의 세포 1.2×10^4를 이용하여 산소 및 영양공급이 원활한 다양한 크기의 세포덩어리 즉, 제작 조건을 최적화하였다. 다양한 크기로 형성된 MB를 3 ~ 4 mm 크기의 거대 조직체인 TM을 제작하는 재료로 이용하였다. 이러한 방법들을 통해 지지체 미개입 밀리미터 스케일의 TM을 형성하였고 이는 앞서 언급되었던 삼차원 배양 시스템들의 한계점들을 극복 가능하다는 점에서 의의가 있다.

TM 제작은 사전에 계산된 수학적, 물리적 조건을 기준으로 아래와 같은 단계를 거친다. 초기에 계산된 값을 바탕으로 제한된 공간에 재배열 된 다양한 크기의 MB들은 (0시간, initiation) 시간이 지남에 따라 가장자리가 중심으로 모이면서 하나의 형태를 이루었다 (12시간, margination). 이후 MB들은 서로 강하게 접착하여 TM의 형태가 더욱 압축되었고 (24시간, condensation), 가장자리가 바닥면으로부터 위쪽으로 올라가는 현상이 관찰되었다 (48시간, lifting). 이후 가장자리가 안쪽으로 모아지면서 가운데 빈 공간을 형성하여 완전한 형태의 TM을 형성하였다 (72시간, folding) (Fig 3). TM 형성 유무는 MB의 배양시간에 따라 결정되었는데, 먼저 MB를 3일 또는 7일간 배양한 후, 기 계산된 조건으로 재배열 하였을 경우, 성공적인 구조를 가진 TM을 제작할 수 있었다. 그러나, 14일간 배양된 MB는 TM 형성에 실패하였다. 다른 연구에서도 마찬가지로, 작은 세포덩어리 여러 개를 14일간 배양 후 크게 뭉쳤을 때 완전히 결합되지 않는다는 결과가 있다 [19]. 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 세포가 줄기세포가 아닌 연골초대배양세포로 분화가 더 진행된 세포인 것이 원인으로 추측된다. 이는 연골모사 거대 조직체 제작 시 연골 분화가 MB 제작 단계에서 7일을 넘지 않아야 하며, TM 제작 시, 배양시간을 72시간 이상으로 하여 분화유도가 필요하다는 것을 암시하고 있다. TM 형태 형성분석 시 사용된 shape factor circularity 및 roundness는 특정한 대상의 형태에 대한 원형정도를 분석하기 위한 지표로 응용된다 [23, 34]. TM이 형성되는 과정에서 group 3 (3+3)과 group 4 (7+3)의 시간대별 circularity 및 roundness를 측정하였다. 그 결과 group 4 (7+3)에서 시간에 따른 circularity 및 roundness값의 변화가 group 3 (3+3)에 비해 더 적게

측정되었고, 이는 MB를 7일간 배양 시 TM이 원에 더 가까운 형태를 유지하면서 형성됨을 의미한다 (Fig 4). TM이 만들어 지는 과정에서 원형에 가까운 형태를 유지하는 것은 이전 유사 연구에서 조직체 형성 과정의 circularity가 유지되는 것과 비슷한 경향으로 사료된다 [23].

MB와 TM의 배양시간에 따라 형성된 조직체의 연골 형성능을 분석하기 위하여 GAG 함량을 측정한 결과, 연골세포에 비해 group 1 (MB)에서 약 1.8배 증가하였고, group 2 (3+1)와 group 3 (3+3)은 group 1 (MB)에 비해서 감소하는 경향을 보였으나, 연골세포와 비슷한 수준을 유지하였다. group 2 (3+1)와 group 3 (3+3)에서 GAG 절대량은 증가하였으나, DNA content도 같이 증가하여, 정량할 경우 감소하는 경향을 보였다 (Fig 5. A, B). 위 결과는 MB 상태가 3일, TM 형성 3일까지는 연골세포의 증식이 일어나고 있음을 대변한다. group 4 (7+3)와 group 5 (14+3)에서는 DNA 함량이 급격히 감소하는데, 이는 세포들이 사멸하는 것으로 판단되며 이는 삼차원 조직체 배양과 연관된 타 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다 [35, 36]. 연골초대배양세포는 줄기세포에 비해 분화가 완전히 진행되어, 시험관 내 MB 형성 후 유지되는 과정에서 세포들이 급격히 사멸 되는 것으로 판단된다. 연골세포에서 MB로, MB에서 TM으로, 시험관 내 거대 조직체로 커지는 과정에서 GAG/DNA 함량 변화 결과, MB 상태 유지가 3일 내에 TM 변환이 이루어지면, 초대배양연골세포와 비슷한 정도의 연골 분화능을 유지하는 것을 알 수 있었다. 이는 본 연구에서 개발한 TM 제작 기술을 치료제에 적극 활용할 경우, 연골세포 수준의 연골 모사 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. H&E 염색 결과 group 4 (7+3)와 group 5 (14+3)에서 세포사멸이 관찰되어, DNA 함량 감소를 조직학적으로 대변한다 (fig 6). 위 결과들을 종합해 보았을 경우, TM 제작 과정에서 MB 상태를 최장 7일까지 유지할 수 있음을 알 수 있다. 콜라겐 Ⅱ에 대한 면역조직화학 염색 결과, MB, TM에서 연골초대배양세포와 같이 강한 양성반응을 나타내었다. 반면 기존의 연골 조직체 형성 연구에서는 조직체 내의 콜라겐Ⅰ 또는 콜라겐 Ⅱ의 발현이 전체적으로 고르지 않고 주변부 또는 중심부에 부분적으로 발현되는 것에 반해 [35, 37] 본 연구는 MB와 TM의 콜라겐 Ⅰ과 콜라겐 Ⅱ의 발현이 조직체 전체에서 고르게 나타나는 것을 확인하였다. 위 결과로 본 연구에서 개발한 거대 연골 모사체인 TM의 연골 기능을 검증하였다.

본 연구에서 제시한 연골초대배양세포 유래 거대 연골조직 모사체인 TM을 제작하는 기술을 치료제 개발에 적용한다면 향후 새로운 세포치료제 개발의 플랫폼이 될 수 있다. TM이 연골초대배양세포와 유사하게 연골적 특성을 유지함을 확인 하였고 3일간 MB를 형성하는 것이 TM을 형성하는데 적당한 조건임을 확인하였다. 이에 본 연구는 지지체 개입이 없는 거대 연골 모사체인 TM 제작 플랫폼을 제시하였으며 향후 임상적으로 적용 가능하도록 발전 시켰을 때 골관절염이나 턱관절장애 치료의 한계점을 극복 할 수 있을 것으로 예상한다.

참 고 문 헌

[1] Ito A, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Kuroki H. (2015) Culture temperature affects human chondrocyte messenger RNA expression in monolayer and pellet culture systems. PloS one. 10(5):e0128082.

[2] Méthot S, Changoor A, Tran-Khanh N, Hoemann CD, Stanish WD, Restrepo A, Shive MS, Buschmann MD. (2016) Osteochondral Biopsy Analysis Demonstrates That BST-CarGel Treatment Improves Structural and Cellular Characteristics of Cartilage Repair Tissue Compared With Microfracture. Cartilage. 7(1):16-28.

[3] Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Ishigro N, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A. (2016) Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. 83:210-9.

[4] McInnes IB, Schett G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol. 7(6):429-42.

[5] McInnes IB, Schett G. (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 365(23):2205-19.

[6] Aryaei A, Vapniarsky N, Hu JC, Athanasiou KA. (2016) Recent Tissue Engineering Advances for the Treatment of Temporomandibular Joint Disorders. Curr Osteoporos Rep. 14(6):269-279.

[7] Adrian U, Jin Y, Wei ST. (2016) Repair and Regeneration of Temporomandibular Joint: The Future of Stem Cell-Based Therapies. Bone and Cartilage Regeneration. 47-75.

[8] Lemos GA, Rissi R, de Souza Pires IL, de Oliveira LP, de Aro AA, Pimentel ER, Palomari ET. (2016) Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the temporomandibular joint. Lasers Med Sci. 31(6):1051-9.

[9] Grogan SP, Barbero A, Diaz-Romero J, Cleton-Jansen AM, Soeder S, Whiteside R, Hogendoorn PC, Farhadi J, Aigner T, Martin I, Mainil-Varlet P. (2007) Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. Arthritis Rheum. 56(2):586-95.

[10] Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. (2015) Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. Nat Rev Rheumatol. 11(1):21-34.

[11] Li S, Oreffo RO, Sengers BG, Tare RS. (2014) The effect of oxygen tension on human articular chondrocyte matrix synthesis: integration of experimental and computational approaches. Biotechnol Bioeng. 111(9):1876-85.

[12] Huey DJ, Athanasiou KA. (2013) Alteration of the fibro cartilaginous nature of scaffoldless constructs formed from leporine meniscus cells and chondrocytes

through manipulation of culture and processing conditions. Cells Tissues Organs. 197(5):360-71.

[13] Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. Trends Biotechnol. 31(2):108-15.

[14] Caron MM, Emans PJ, Coolsen MM, Voss L, Surtel DA, Cremers A, van Rhijn LW, Welting TJ. (2012) Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. Osteoarthritis Cartilage. 20(10):1170-8.

[15] Stenhamre H, Thorvaldsson A, Enochson L, Walkenström P, Lindahl A, Brittberg M, Gatenholm P. (2013) Nano sized fibers′ effect on adult human articular chondrocytes behavior. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 33(3):1539-45.

[16] Hoshi K,Fujihara Y,Mori Y,Asawa Y,Kanazawa S,Nishizawa S,Misawa M,Numano T, Inoue H, Sakamoto T, Watanabe M, Komura M, Takato T. (2016) Production of three-dimensional tissue-engineered cartilage through mutual fusion of chondrocyte pellets. Int J Oral Maxillofac Surg. 45(9):1177-85.

[17] Moutos FT, Glass KA, Compton SA, Ross AK, Gersbach CA, Guilak F, Estes BT. (2016) Anatomically shaped tissue-engineered cartilage with tunable and inducible anticytokine delivery for biological joint resurfacing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2;113(31): E4513-22.

[18] Stenhamre H, Thorvaldsson A, Enochson L, Walkenström P, Lindahl A, Brittberg M, Gatenholm P. (2013) Nanosized fibers′ effect on adult human articular chondrocytes behavior. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 33(3):1539-45.

[19] Babur BK, Ghanavi P, Levett P, Lott WB, Klein T, Cooper-White JJ, Crawford R, Doran MR. (2013) The Interplay between Chondrocyte Redifferentiation Pellet Size and Oxygen Concentration. PLoS One. 8(3):e58865.

[20] Raimondi MT, Bonacina E, Candiani G, Laganà M, Rolando E, Talò G, Pezzoli D, D′Anchise R, Pietrabissa R, Moretti M. (2011) Comparative chondrogenesis of human cells in a 3D integrated experimental‐computational mechanobiology model. Biomech Model Mechanobiol. 10(2):259-68.

[21] Ito A, Nagai M, Tajino J, Yamaguchi S, Iijima H, Zhang X, Aoyama T, Kuroki H. (2015) Culture Temperature Affects Human Chondrocyte Messenger RNA Expression in Monolayer and Pellet Culture Systems. PLoS One. 10(5):e0128082.

[22] Sabatino MA, Santoro R, Gueven S, Jaquiery C, Wendt DJ, Martin I, Moretti M, Barbero A. (2015) Cartilage graft engineering by co-culturing primary human articular chondrocytes with human bone marrow stromal cells. J Tissue Eng Regen Med. 9(12):1394-403.

[23] Vrij E, Rouwkema J, LaPointe V, van Blitterswijk C, Truckenmüller R, Rivron N. (2016) Directed Assembly and Development of Material-Free Tissues with Complex Architectures. Adv Mater. 28(21):4032-9.

[24] Leferink A, Schipper D, Arts E, Vrij E, Rivron N, Karperien M, Mittmann K, van Blitterswijk C, Moroni L, Truckenmüller R. (2014) Engineered micro-objects as scaffolding elements in cellular building blocks for bottom-up tissue engineering approaches. Adv Mater. 26(16):2592-9.

[25] Mačiulaitis J, Rekštytė S, Ūsas A, Jankauskaitė V, Gudas R, Malinauskas M2, Mačiulaitis R. (2016) Characterization of tissue engineered cartilage products: Recent developments in advanced therapy. Pharmacol Res. 113(Pt B):823-832.

[26] Bastiaansen-Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart AC, van der Linden JC, Zuurmond AM, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ, Degroot J. (2008) Contribution of collagen network features to functional properties of engineered cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 16(3):359-66.

[27] Huey DJ, Athanasiou KA. (2013) Alteration of the fibrocartilaginous nature of scaffoldless constructs formed from leporine meniscus cells and chondrocytes through manipulation of culture and processing conditions. Cells Tissues Organs 197(5):360-71.

[28] Cherian JJ, Parvizi J, Bramlet D, Lee KH, Romness DW, Mont MA. (2015) Preliminary results of a phase II randomized study to determine the efficacy and

safety of genetically engineered allogeneic human chondrocytes expressing TGF-β1 in patients with grade 3 chronic degenerative joint disease of the knee. Osteoarthritis Cartilage. 23(12):2109-18

[29] Lee KH, Song SU, Hwang TS, Yi Y, Oh IS, Lee JY, Choi KB, Choi MS, Kim SJ. (2001) Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts. Hum Gene Ther. 12(14):1805-13.

[30] Stocco E, Barbon S, Radossi P, Rajendran S, Dalzoppo D, Bortolami M, Bagno A, Grandi F, Gamba PG, Parnigotto PP, Tagariello G, Grandi C. (2016) Autologous chondrocytes as a novel source for neo-chondrogenesis in haemophiliacs. Cell Tissue Res. 366(1):51-61.

[31] Wang L, Verbruggen G, Almqvist KF, Elewaut D, Broddelez C, Veys EM. (2001) Flow cytometric analysis of the human articular chondrocyte phenotype in vitro. Osteoarthritis Cartilage. 9(1):73-84.

[32] Schubert T, Anders S, Neumann E, Schölmerich J, Hofstädter F, Grifka J, Müller-Ladner U, Libera J, Schedel J. (2009) Long-term effects of chondrospheres on cartilage lesions in anautologous chondrocyte implantation model as investigated in the SCID mouse model. Int J Mol Med. 23(4):455-60.

[33] Scotti C, Osmokrovic A, Wolf F, Miot S, Peretti GM, Barbero A, Martin I. (2012) Response of Human Engineered Cartilage Based on Articular or Nasal

Chondrocytes to Interleukin-1β and Low Oxygen. Tissue Eng Part A. 18(3-4):362-72.

[34] Zevian SC, Johnson JL, Winterwood NE, Walters KS, Herndon ME1, Henry MD, Stipp CS. (2015) CD151 promotes α3β1 integrin-dependent organization of carcinoma cell junctions and restrains collective cell invasion. Cancer Biol Ther. 16(11):1626-40.

[35] Futrega K, Palmer JS, Kinney M, Lott WB, Ungrin MD, Zandstra PW, Doran MR. (2015) The microwell-mesh: A novel device and protocol for the high throughput manufacturing of cartilage microtissues. Biomaterials. 62:1-12.

[36] Yoon IS, Chung CW, Sung JH, Cho HJ, Kim JS, Shim WS, Shim CK, Chung SJ, Kim DD. (2011) Proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in porous hyaluronic acid scaffold. J Biosci Bioeng. 112(4):402-8.

[37] Shi Y, Ma J, Zhang X, Li H, Jiang L, Qin J. (2015) Hypoxia combined with spheroid culture improves cartilage specific function in chondrocytes. Integr Biol (Camb). 7(3):289-97.

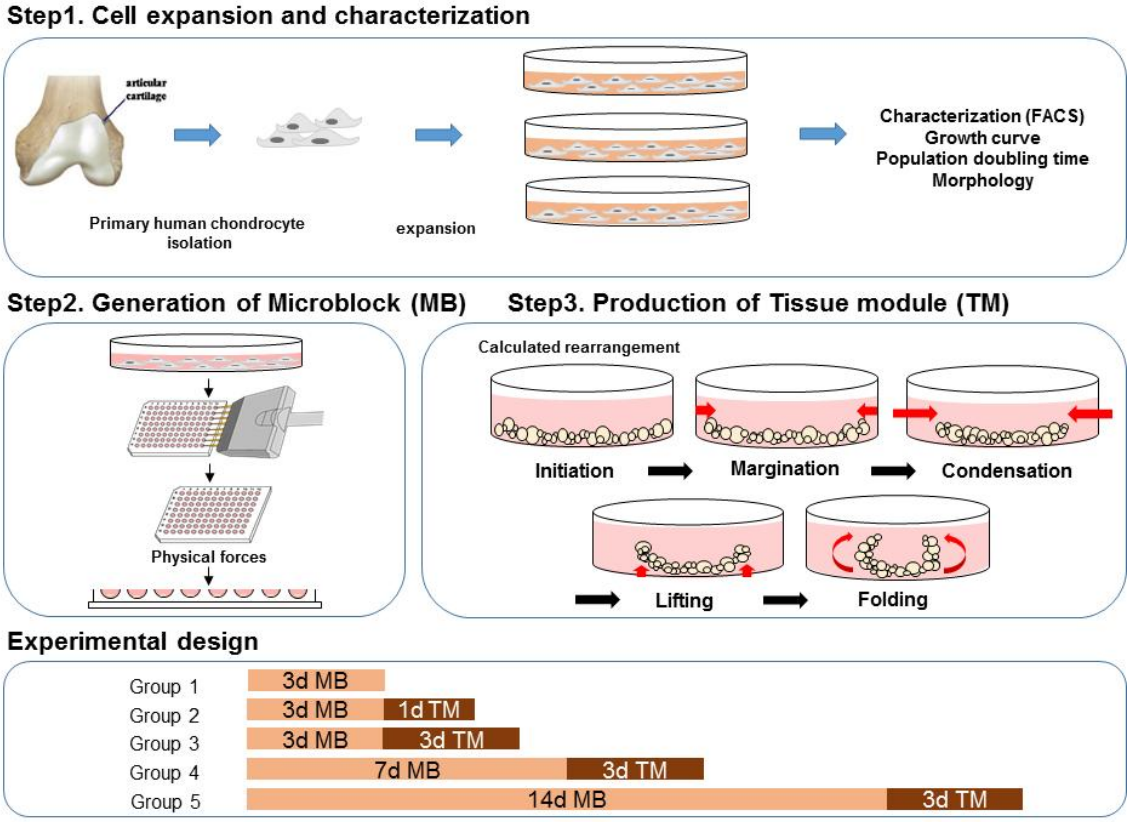

Figure. 1. TM 형성 과정의 실험설계 모식도. Step1, 사람 연골초대배양세포를 분리 후 배양하였고 FACS로 특성분석을 하였다; Step2, 96-well plate에 well당 연골세포 12000개를 넣고 원심분리하여 MB를 형성하였다; Step3, TM은 Initiation, margination, condensation, lifting and folding의 과정을 거쳐서 형성되었다; Experimental design, group 1, 3일 MB; group 2, MB 3일 TM 1일; group 3, MB 3일 TM 3일; group 4, MB 7일 TM 3일; group 5, MB 14일 TM 3일.

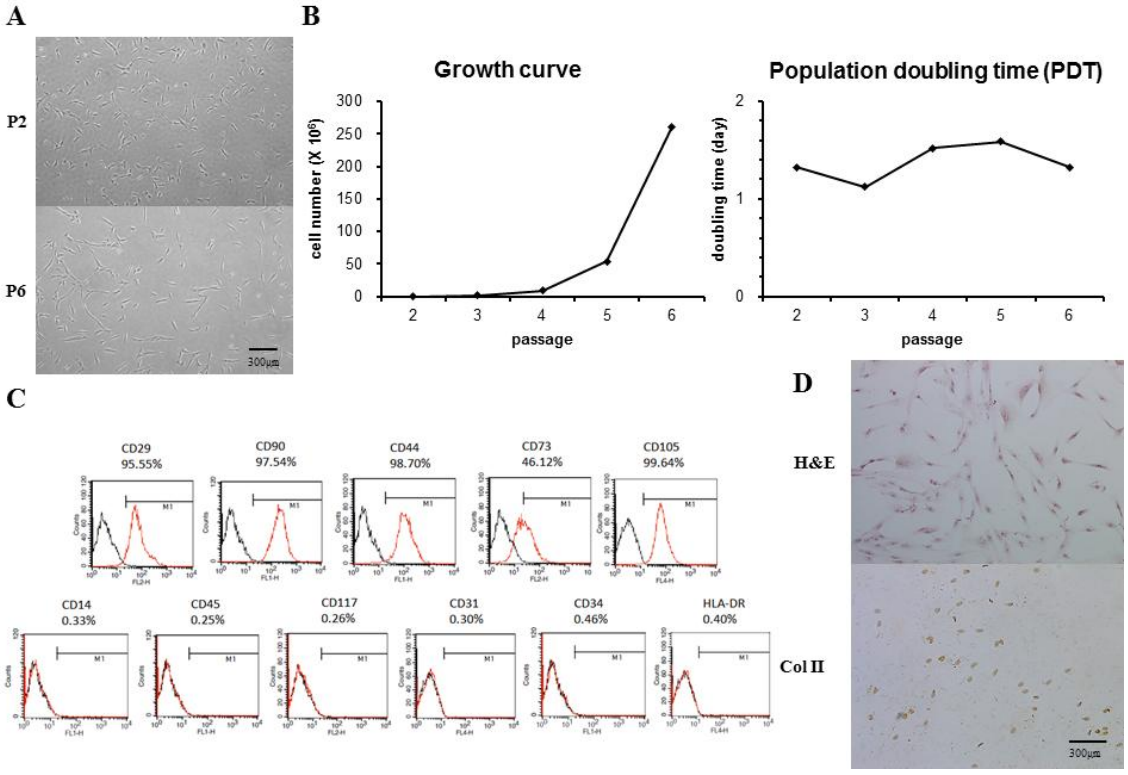

Figure. 2. 사람 연골초대배양세포 특징분석. (A) 분리한 연골 세포의 2계대 (P2), 6계대 세포의 형태 분석을 위한 현미경 사진을 촬영하였다 (P6). 기준자는 300 μm를 나타낸다. (B) 2계대부터 6계대 사람 연골초대배양세포의 Growth curve와 PDT를 측정하였다. (C) 사람 연골초대배양세포는 중간엽 줄기세포와 연골세포 지표 (CD29, CD90, CD44, CD73, CD105)와 줄기세포 음성 지표 (CD14, CD45, CD117, CD31, CD34, HLA-DR)에 대해 FACS로 분석하였다. (D) 사람 연골초대배양세포의 H&E 염색과 콜라겐 Ⅱ 면역염색화학법 결과이다. 기준자는 300 μm를 나타낸다.

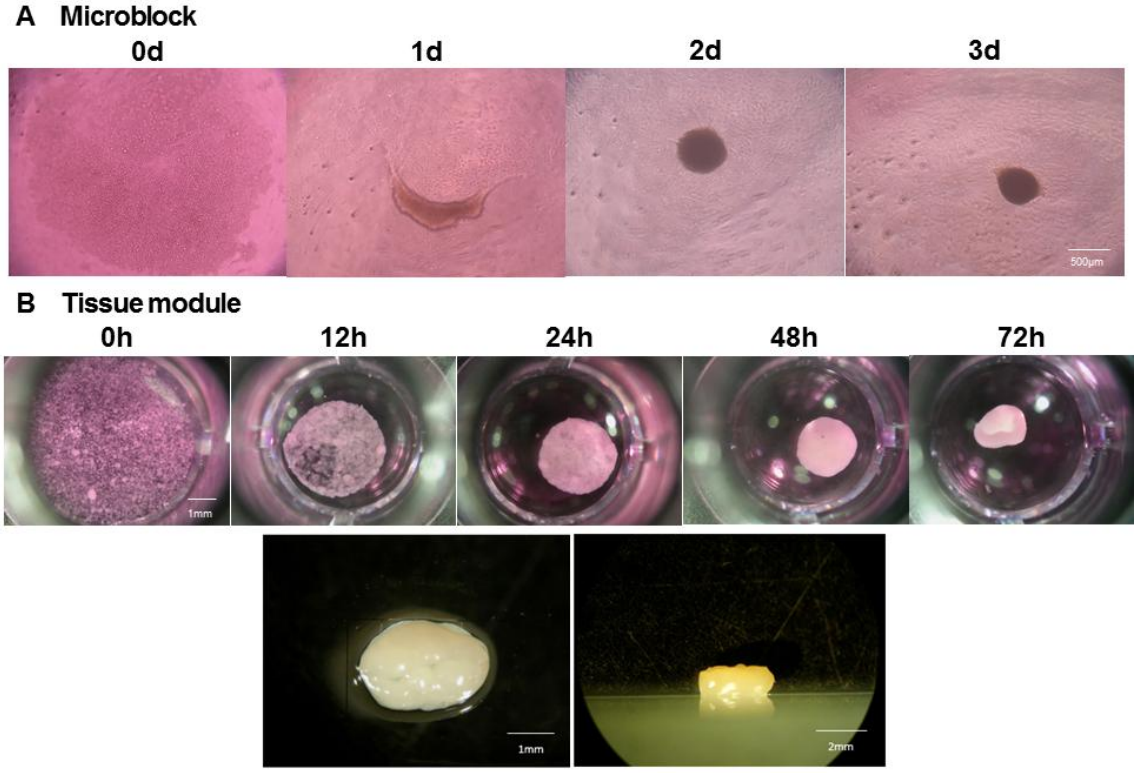

Figure. 3. MB와 TM의 형태분석. (A) 3일간 MB을 형성하는 과정의 현미경 사진을 하루 간격으로 촬영하였다. 기준자는 500 μm를 나타낸다. (B) 3일간 TM이 형성되는 과정을 12시간 간격으로 촬영한 사진이다. 기준자는 각각 1 mm와 2 mm를 나타낸다.

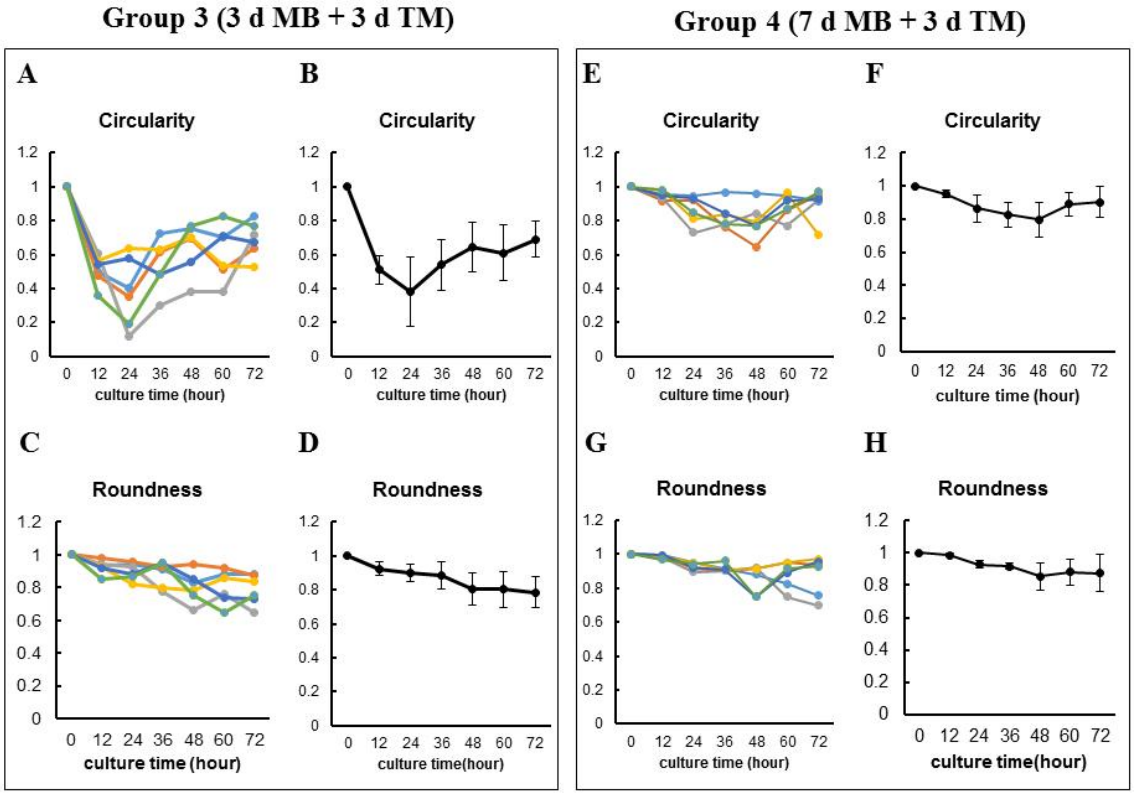

Figure. 4. TM이 형성되는 과정에서 형태 지표인 circularity와 roundness를 측정한 결과. (A-D) group 3 (3+3)에서 circularity와 roundness를 12시간 간격으로 측정하였다. (A) 6개의 TM 각각의 circularity를 나타낸 그래프이다. (B) 6개의 TM circularity의 평균값을 나타낸 그래프이다. (C) 6개의 TM 각각의 roundness를 나타낸 그래프이다. (D) 6개의 TM roundness의 평균값을 나타낸 그래프이다. (E-H) group 4 (7+3)에서 circularity와 roundness를 12시간 간격으로 측정하였다. (E) 6개의 TM 각각의 circularity를 나타낸 그래프이다. (F) 6개의 TM circularity의 평균값을 나타낸 그래프이다. (G) 6개의 TM 각각의 roundness를 나타낸 그래프이다. (H) 6개의 TM roundness의 평균값을 나타낸 그래프이다.

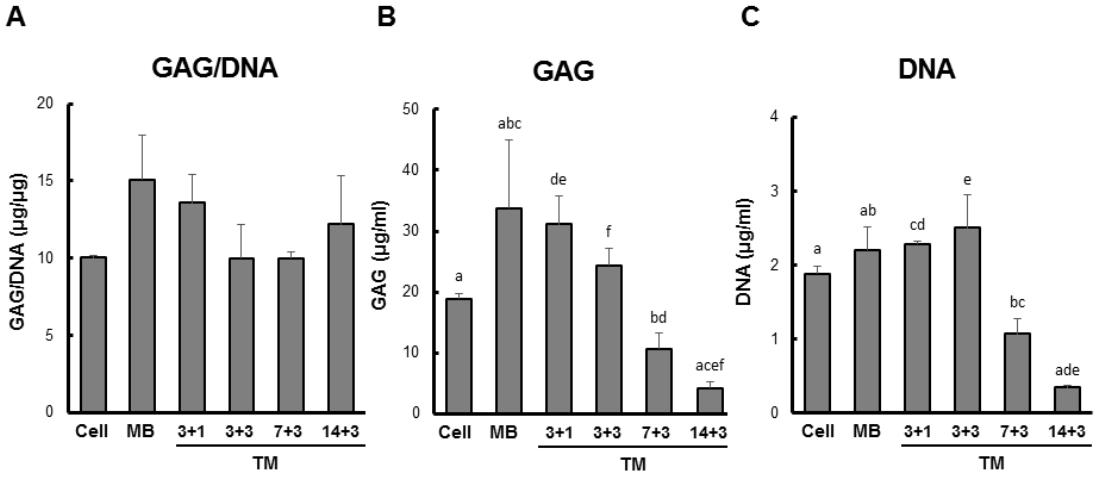

Figure. 5. 대조군과 실험군의 GAG와 DNA 함량 측정 결과 (A) GAG함량은 DNA양으로 정량하였다. (B) 연골세포와 MB, TM 그룹의 GAG 함량이다. (C) 연골세포와 MB, TM 그룹의 DNA 함량이다. 결과는 평균값 ± 측정표준편차 (mean ± S.D)로 표시하였다 (n=3). 유의적 차이가 있는 그룹끼리 같은 알파벳으로 표시하였다 (P value < 0.05).

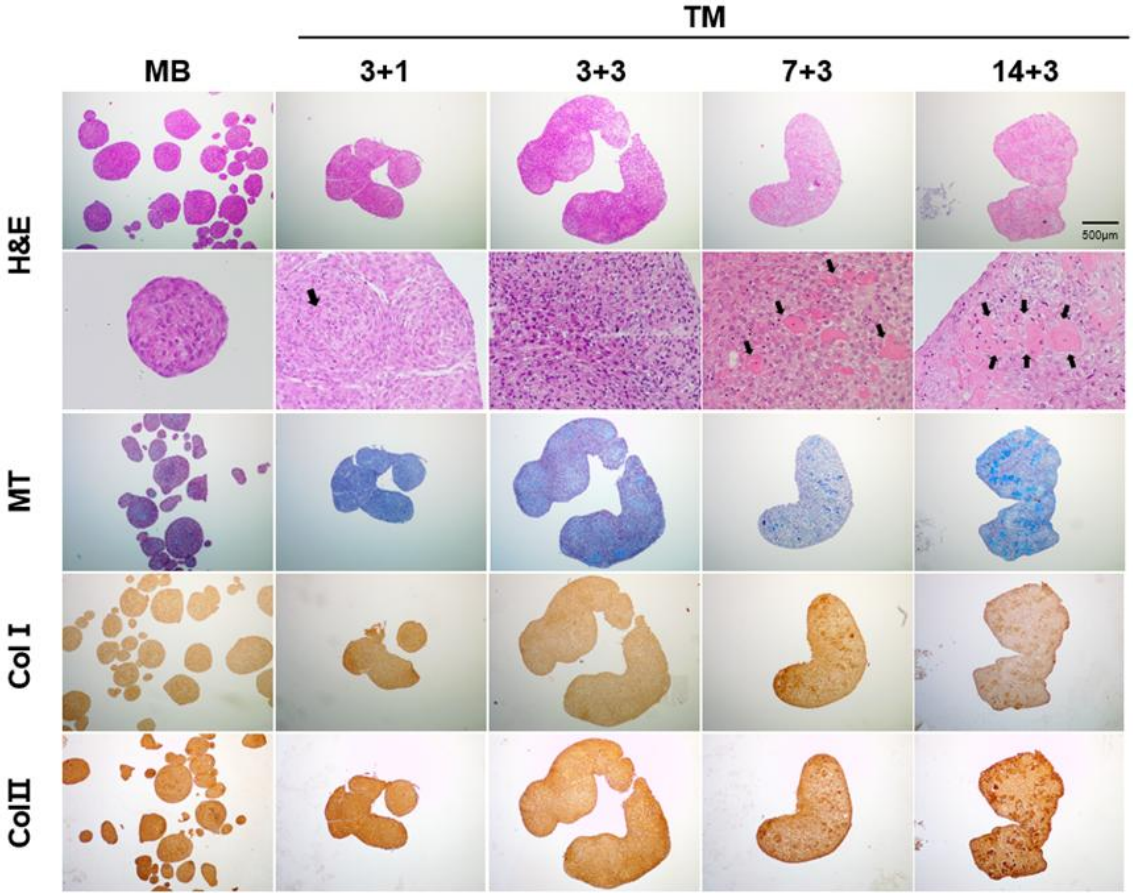

Figure. 6. 특수염색과 면역화학염색을 통한 조직학적 분석. MB와 TM그룹의 H&E, MT 염색을 진행하였다. 또한 면역화학염색을 통해 콜라겐 Ⅰ, Ⅱ 콜라겐 발현 정도를 확인하였다. 검은색 화살표는 ECM와 콜라겐을 표시하였다. 기준자는 500 μm를 나타낸다.

Abstract

Human chondrocyte-derived scaffold free tissue module generation

Lee song yi

Dental Regenerative Biotechnology Major
The Graduate school, Seoul National University
(Directed by Prof. Cho, Jaejin)

There are limitation of therapies for osteoarthritis and temporomandibular disorder. Recently, autologous chondrocyte implantation and stem cell therapy are used for patients, but the effect is limited. To overcome this problem, many researchers are trying to develop three-dimentional cartilage-mimic structures. In this study, we developed millimeter-scale cartilage-mimic tissue module, artificial material-free based on primary chondrocyte. Firstly, micrometers scaled microblock was produced using chondrocytes. Secondly, tissue module was generated using microblocks. Isolated human primary chondrocytes were characterized by FACS and growth curve, population doubling time. I designed the experimental groups to optimize the best conditions for TM culture as following (Control group, human primary chondrocytes; group1, 3 days MB; group2, MB 3 days TM 1 day; group3, MB 3 days TM 3 days; group4, MB 7 days TM 3 days; group5, MB 14 days TM 3 days). Human primary chondrocytes at passage 6 were used for this study and significant differences were not represented between passage 2 and 6 in population doubling time and growth curve. Circularity and roundness were measured to analyze shape

properties of TM. The variation of circularity and roundness was lower in group 4 (7+3) than group 3 (3+3). In GAG analysis, 3 days MB culture group represents higher GAG contents than control group. I demonstrated that MB and TM have chondrogenic characteristic as much as human primary chondrocytes. Additionally I provide the platform for 3D scaffold-free culture system that can apply to the limitation of conventional TMD or OA therapy.

Keyword: human primary chondrocyte, three dimensional fabrication, scaffold-free, microblock, tissue module, cartilage, tissue engineering
Student Number: 2015-23265