

돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질 하이드로겔 지지체를 활용한 가슴샘상피세포의 3차원 배양

김휘곤^{1,†}, 황선영^{2,†}, 이리라², 윤 식²

부산대학교 의과대학 ¹산부인과학교실, ²해부학교실

Three-Dimensional Culture of Thymic Epithelial Cells on Decellularized Porcine Liver Extracellular Matrix Hydrogel Scaffolds

Hwi-Gon Kim^{1,†}, Seon-Yeong Hwang^{2,†}, Ri-Ra Lee², Sik Yoon²

Department of ¹Obstetrics and Gynecology, ²Anatomy, College of Medicine, Pusan National University

Abstract : Thymic epithelial cells (TECs), as key stromal components, form a three-dimensional sponge-like network that creates the microenvironment critical for T cell development. Physical and biochemical interactions between TECs and developing thymocytes within this network are indispensable for proper T cell maturation. However, conventional two-dimensional (2D) cell culture systems fail to replicate the thymic microenvironment, leading to reduced TEC functionality and impaired T cell development. Three-dimensional (3D) cell culture offers a more physiologically relevant model by enabling cells to grow within structured scaffolds that facilitate interactions with neighboring cells and the extracellular matrix (ECM), thereby mimicking the *in vivo* environment. Scaffolds that replicate the structural and biochemical properties of the ECM are essential for implementing 3D culture. Decellularized extracellular matrix (dECM) scaffolds meet these requirements by preserving the native structure and bioactivity of the ECM after cellular components are removed. dECM-based scaffolds support diverse cellular activities, such as proliferation, migration, and differentiation, without the need for additional biological factors, making them ideal for tissue engineering applications. In this study, we developed a bioactive hydrogel derived from porcine liver dECM (dPLECM) to support the 3D culture of TECs. Interestingly, TECs grown in the 3D dPLECM hydrogel displayed distinctive cellular properties and molecular profiles compared with those cultured in 3D agarose hydrogel or conventional 2D systems. This was evidenced by increased cell proliferation, spheroid formation, survival, and invasion, as well as by the upregulated expression

*이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

†These authors contributed equally to this work.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

Received: December 1, 2024; **Revised:** December 18, 2024;

Accepted: December 19, 2024

Correspondence to: 윤 식(부산대학교 의과대학 해부학교실)

E-mail: sikyoon@pusan.ac.kr

of crucial thymopoietic factors, such as GM-CSF, IL-7, and TARC, in TECs cultured in the 3D dPLECM hydrogel scaffolds. Taken together, the results of this study demonstrate an efficient 3D culture model for TECs using dPLECM hydrogel scaffolds. This model closely replicates the native thymic microenvironment, advances our understanding of TEC behavior in 3D culture, and highlights the potential of dPLECM hydrogels for applications in T cell development, thymic organoid bioprinting, and thymus regeneration.

Keywords : Thymic epithelial cell, Decellularized extracellular matrix, Hydrogel, 3D cell culture

서 론

세포나 조직의 형태, 기능 및 병리생리를 완전히 이해하려면, 살아 있는 장기 내에서 세포와 조직의 특성과 행동을 연구하는 것이 필수적이다. 생체 내 장기(organ)는 특정 기능을 수행하기 위해 두 가지 이상의 조직(tissue)이 밀접하게 결합하고 조직화된 구조를 이루며, 3차원적인 형태, 기계적 특성, 그리고 생화학적 미세 환경 측면에서 매우 역동적이고 가변적인 특성을 지닌다[1]. 생물학적 연구에서 실험 모델은 복잡한 생명 현상을 이해하고 새로운 지식을 발견하는 데 핵심적인 도구로 사용된다. 세포, 조직 또는 동물 등으로 구성된 실험 모델은 실제 생명체의 구조와 기능을 재현하여 가설을 검증하거나 생리적 과정을 모사할 수 있다. 이를 통해 연구자는 인간을 포함한 생물체에서 발생하는 질병의 원인, 치료법 및 생명 현상의 기본 메커니즘을 안전하고 윤리적으로 탐구할 수 있다.

동물 모델은 생체 내 생리적 과정을 정밀하게 재현할 수 있는 장점을 가지지만, 영상화의 어려움, 설명되지 않은 차이점, 낮은 처리량, 그리고 인간과의 본질적인 생물학적 차이와 같은 한계가 있다[2]. 반면, 생명과학 연구에서 가장 널리 사용되는 2차원 단층 세포배양모델은 간단하고 재현 가능성이 높으며 처리량이 높은 장점을 제공하지만, 생체 환경에서의 중요한 특성인 세포-세포 및 세포-세포바깥바탕질(extracellular matrix, ECM) 상호작용을 재현하지 못하는 중요한 제한점을 가진다[3]. 이로 인해, 2차원 세포배양 모델은 종종 살아 있는 조직에서 관찰되는 세포 기능과 신호 경로를 정확히 재현하는 데 실패하며, 이는 실험 결과의 생체적합성에 심각한 영향을 미칠 수 있다[4].

이러한 한계를 극복하고 전통적인 2차원 세포배양과 동물 모델의 간극을 메우기 위해, 공학적으로 설계된 미세환경을 갖춘 새로운 3차원 세포배양 플랫폼이 개발되었다[5]. 3차원 세포배양에서는 세포가 조직화된 기질 내에서 성장하며, 이 과정에서 이웃 세포 및 세포바깥바탕질과의 상호

작용에 의해 세포의 행동이 조절된다[6]. 이를 통해 세포는 생체 내 환경을 보다 정밀하게 모방하는 표현형을 나타내며, 다양한 자극에 반응하여 현실적인 미세환경을 재현할 수 있다[5]. 최근 연구들은 3차원 세포배양이 기본 세포 생물학의 발전에 있어 중요한 도구로서 역할을 한다는 점을 강조하고 있다[7]. 3차원 세포배양을 구현하기 위해서는 생리학적 세포바깥바탕질을 모사하여 세포 성장, 증식, 이동에 필수적인 물리적 및 생화학적 신호를 제공하는 지지체(scaffold)가 필수적이다.

하이드로겔(hydrogel)은 가교된 고분자 사슬 네트워크로 구성되어 물을 함유할 수 있는 특성을 가지며, 생체 세포바깥바탕질을 모사할 수 있는 능력 덕분에 3차원 세포배양의 주요 지지체로 부각되었다[8]. 천연 및 합성 고분자에서 유래된 하이드로겔은 세포 부착, 증식, 분화 등 다양한 세포 행동을 연구하는 데 널리 사용되고 있다[9]. 대표적인 하이드로겔에는 콜라겐(collagen), 젤라틴(gelatin), 피브린(fibrin) 및 라미닌(laminin)과 같은 동물 유래 물질, 알지네이트(alginate)와 아가로스(agarose)와 같은 식물 유래 물질, 그리고 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol) 및 폴리 카프로락톤(polycaprolactone)과 같은 합성 물질이 포함된다. 그러나 이러한 세포바깥바탕질 성분이나 합성 고분자를 단독으로 이용한 하이드로겔은 생체 세포바깥바탕질의 구성 및 구조적 다양성을 완전히 재현하지 못한다[10].

따라서, 3차원 세포배양 연구의 주요 목표 중 하나는 생체 환경을 정밀히 모방할 수 있는 새로운 생체재료 기반 접근법을 개발하는 것이다. 탈세포화 세포바깥바탕질(decellularized extracellular matrix, dECM)을 기반으로 한 하이드로겔은 이러한 요구를 충족시키며 3차원 세포배양 및 조직공학에서 독특한 이점을 제공한다[11]. dECM은 세포 성분 제거 후 세포바깥바탕질의 구조와 구성을 보존하며, 조직 특이적 세포 행동에 필수적인 생물학적 신호를 유지한다[12]. 이는 진피, 소장 점막하층, 간 등 다양한 조직에서 유래할 수 있으며, 구조적 지지, 성장인자, 세포 접착 단

백질 등을 제공하여 세포의 성장과 조직의 재생을 촉진한다[13]. 특히, dECM 기반 재료는 생체 내 미세환경을 모방할 수 있는 능력으로 인해 추가적인 생물학적 인자 없이도 세포 증식, 이동, 침투, 분화 등의 다양한 세포 활동을 촉진할 수 있는 점에서 매력적인 소재로 간주된다[14].

가슴샘(thymus)은 성숙하고 자기 관용적인 T세포 생성을 조절하는 중추 림프기관이다. T세포는 병원체 및 암세포에 대한 면역 반응의 핵심적인 구성 요소이다. 하지만 나이가 들면서 병원체, 종양 및 백신 등에 대한 T세포의 반응 능력은 감소하며, 류마티스관절염(rheumatoid arthritis), 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus) 및 다발경화증(multiple sclerosis) 등 자가면역질환이나 백혈병(leukemia) 및 림프종(lymphoma)과 같은 암과 같은 질환의 발병에 관여할 수 있다[15]. 따라서, 가슴샘 내에서 T세포의 발달을 제어하는 방법의 이해는 새로운 T세포 기반 치료법 개발을 위해 필수적이다.

가슴샘상피세포(thymic epithelial cell)는 가슴샘의 주요 기질 구성 요소로, 스펀지 형태의 3차원 구조를 이루며 T세포 발달에 중요한 미세환경을 형성한다[16]. 그러므로 가슴샘상피세포와 발달 중인 T세포인 가슴샘세포(thymocyte) 사이의 물리적 및 생화학적 상호작용은 가슴샘상피세포의 3차원 그물구조 내에서 발생하며, 이는 적절한 T세포 발달 및 선택을 위해 필수적이다[17]. 그러나 기존의 2차원 세포배양 시스템은 가슴샘 미세환경을 재현하지 못하여 가슴샘상피세포의 주요 분자 인자 발현을 감소시키고 기능 저하를 유발함으로써 효과적인 T세포 발달을 유도하지 못하는 한계를 초래한다[18,19]. 이에 비해 3차원 가슴샘상피세포 배양은 세포가 구조화된 지지체 내에서 성장하면서 이웃 세포 및 세포바깥바탕질과 상호작용할 수 있도록 하여 생체 내 환경을 보다 정밀하게 모사하며, 세포의 성장과 기능을 촉진할 수 있다.

현재, 완전히 기능적인 가슴샘상피세포를 유지하거나 분화시키는 세포배양 프로토콜은 아직 정립되어 있지 않다. OP9-DL1/-DL4 세포를 기반으로 한 2D *in vitro* 모델은 T세포 발달 초기 단계를 유도하는 데 사용되어 왔으나, T세포 선택 과정을 완전히 재현하지 못하는 한계가 있다[20]. 현재까지 가슴샘상피세포의 3차원 배양에 대한 다양한 접근 방법이 시도되었지만[21-32], 생체 모사형 3차원 가슴샘상피세포 배양 모델을 확립하는 것은 여전히 도전 과제로 남아 있다.

3차원 세포배양에 필수적인 지지체를 제작하기 위해 사용되는 재료 중에서 dECM은 다른 재료와 달리 생체 세포 바깥바탕질 성분과 다수의 성장 인자를 포함하고 있는 장

점을 가지는 것으로 알려져 있기 때문에[11,12,14,33,34], 본 연구에서는 돼지 간 유래의 dECM을 활용하여 가슴샘상피세포의 3차원 배양을 지지하고, 가슴샘상피세포의 증식, 생존, 스페로이드 형성 및 활성을 증진시킬 수 있는 생활성 하이드로겔을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

시미안바이러스 40 T 항원 형질전환 마우스로부터 얻어진 가슴샘상피세포는 Barbara B. Knowles 박사(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)로부터 제공받았다. 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Hyclone, GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, USA)에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 100 IU/mL 페니실린, 100 mg/mL 스트렙토마이신(Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 첨가하여 배양하였으며, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 가슴된 환경에서 배양되었다. 준밀집 상태의 세포는 trypsin-EDTA로 수확하여 추가 실험에 사용되었으며, 배지는 2일에 한 번씩 교체하였다.

2. 돼지 간 유래 dECM의 제작

당일 도축한 신선한 돼지 간은 축산물공판장에서 구입하였으며, 실험실까지는 4°C 인산완충식염수(phosphate buffered solution, PBS)에 넣어 운반하였다. 돼지 간 조직의 탈세포화를 위해 10×10×10 mm³ 이하 부피의 정육면체 형태로 절단하고 PBS로 세 번 이상 세척하였다. 절단된 돼지 간 조직은 0.5 w/v% 황산도데실나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 및 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma-Aldrich) 용액에서 2일간 침지된 상태로 교반하였으며, 용액이 혈액으로 오염되면 교체하였다. 세포 성분이 제거되어 투명해진 조직은 PBS 용액으로 2일간 세척하였으며 4시간 주기로 세척액을 교체해 주었다. 세척이 끝난 조직은 4% 에탄올 용액에서 4시간 동안 탈수과정을 거친 후 동결건조하였다.

동결건조된 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질(decellularized pig liver extracellular matrix, dPLECM)의 가용화를 위해 dPLECM 분말 1 g과 100 mg의 펩신(~3000 unit/mg, Sigma-Aldrich)을 100 mL 0.01 N HCl 용액에 첨

가한 후, 실온에서 2일간 교반하여 완전 용해하였다. 반응이 끝난 후 pH를 7.4로 조정하여 펩신을 비활성화하였고, 가용화된 dPLECM 용액의 겔화 방지를 위해 온도는 10°C 이하로 유지하였다. 가용화된 dPLECM을 60°C에서 1시간 가열하고 0.45 µm 주사기 필터(28 mm Syringe Filter, Corning, NY, USA)를 사용하여 불순물을 제거하였다. dPLECM 저장용액(stock solution)은 10 mg/mL 농도로 제조하였다.

3. dPLECM의 특성 분석

dPLECM의 세포적합성 평가는 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색에 의한 조직학적 분석과 DNA 정량화를 통해 이루어졌다. DNA의 함량은 Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Nanodrop 200C)을 사용하여 측정하였다.

H&E 염색을 위해 탈세포화 전후의 간을 동결조직 포매제(optimal cutting temperature compound, OCT compound, Lecia Biosystems, Richmond, IL, USA)를 사용하여 동결표본을 만든 후 동결조직절편기(CM3050 Cryocut, Lecia Biosystems)로 6 µm 두께의 절편을 제작하였다. 동결조직절편을 50°C에서 2시간 건조한 후 -20°C에서 20분 동안 100% 아세톤으로 고정하였다. 고정된 조직절편은 팬을 이용하여 3시간 동안 건조시키고 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 및 50% 에탄올을 단계별로 농도를 낮추어 각각 3분씩 통과시켜 수화시켰다. 수화된 조직절편을 Mayer's Hematoxylin (Abcam, Waltham, MA, USA) 용액에서 2분 동안 염색하고, 흐르는 수돗물에 10분간 세척한 뒤, 1~2분 동안 Eosin (Sigma-Aldrich) 용액으로 염색하였다. Eosin 염색 후 순서대로 95%와 100% 알코올 용액에 담가 탈수하고 carboxylene 용액에 10회 담가 알칼 성분 제거하였다. 마지막으로, 자일렌(xylene)을 1~3단계로 준비하고 10분 동안 차례대로 통과시켜 투명한 뒤, Entellan (Sigma-Aldrich)으로 봉입하고 건조하여 현미경(BX53, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

간 조직의 total DNA 추출은 GenEX™ Tissue Kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 지침서를 실험조건에 맞게 변형하여 수행하였다. 신선 간 조직과 탈세포화 간 조직을 균질화한 후 각각 10 mg씩 300 µL의 Buffer AL이 담겨있는 1.5 mL 마이크로 튜브에 넣어주고 0.9 µL의 Proteinase K (20 mg/mL)를 첨가한 후 혼합하였다. 각각의 조직을 가열 장치에 넣고 56°C에서 완전 소화될 때까지 충분히 반응시킨 후, RNase 용액 1 µL를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응하여 실온에서 냉각하였다. 냉각이 끝난 후, 100 µL의 Buffer PP를 첨가하여 진탕하고

얼음 위에서 5분간 안정화하였다. 그 후 각각의 반응 마이크로 튜브는 14,000×g에서 1분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후, 300 µL의 isopropanol을 추가하여 이 혼합액을 흰색 실 가닥 형태의 가시적인 덩어리 형태로 DNA를 분리하였다. 분리된 total DNA는 70% 에탄올을 이용하여 2회 세척한 후 100 µL의 증류수에 용해시켜 Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 DNA의 함량을 측정하였다.

4. dPLECM의 세포 적합성 평가

가슴샘상피세포는 1×10^4 세포/mL의 농도로 96-웰 플레이트에 파종하였다. 6시간 후 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척한 뒤, 각 웰당 배지 200 µL에 dPLECM의 농도가 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3% 및 0.4% 농도가 되도록 dPLECM을 첨가하였다. 그 후 세포를 37°C에서 24시간 및 48시간 동안 배양하고 세포 증식을 평가하기 위해 WST-1 기반 분석 용액(EZ-Cytox assay, Daeil Lab Service, Seoul, Korea)을 각 웰에 10:1 비율로 첨가하였으며, 활성 세포에서 탈수소효소 반응에 의해 생성된 포르마잔 염료의 흡광도는 450 nm에서 마이크로플레이트 리더기(Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 모든 실험은 독립적으로 3회 반복하여 수행하였다.

5. dPLECM 하이드로겔 지지체의 제작

dPLECM 기반의 하이드로겔 지지체를 제작하기 위해 2% 고융점 아가로스 용액과 1% dPLECM 용액을 준비하였다. 0.125% 아가로스가 함유된 100 µL 용량의 하이드로겔을 만들기 위해 93.75 µL의 1×10^5 세포/mL을 포함한 배지와 6.25 µL의 2% 아가로스 용액을 1.5 mL 마이크로 튜브에서 35~40°C에서 혼합하고, 1 mL 주사기에 옮겨 4°C에서 5분간 겔화시켰다.

dPLECM 하이드로겔(0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%) 지지체를 제작하기 위해 각각 92.75, 88.75, 83.75, 78.75 및 73.75 µL의 가슴샘상피세포 현탁액(1×10^5 세포/mL)과 1%, 5%, 10%, 15%, 20% 및 30 µL의 1% dPLECM 용액을 혼합하고 6.25 µL의 2% 아가로스 용액을 첨가하여 동일한 방식으로 제조하였다.

6. dPLECM 하이드로겔의 세포증식능 평가

2차원 세포배양에서 dPLECM의 농도에 따른 가슴샘상피세포의 세포적합성을 비교하기 위하여 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3% 및 0.4% dPLECM을 세포배양 플레이트 바닥에 코

팅 후 세포를 파종한 다음 배양 1일 및 2일째에 water-soluble tetrazolium (WST)-1 기반 분석법을 통해 세포 증식을 분석하였다. 또한 3차원 세포배양에서 dPLECM의 농도에 따른 가슴샘상피세포의 세포적합성을 비교하기 위하여 0.125% 아가로스, 0.125% 아가로스-0.1% dPLECM, 아가로스, 0.125% 아가로스-0.2% dPLECM, 아가로스, 0.125% 아가로스-0.3% dPLECM 및 아가로스, 0.125% 아가로스-0.4% dPLECM 하이드로겔에서 배양 3일 및 5일째에 WST-1 기반 분석법을 통해 세포 증식을 분석하였다.

세포적합성이 가장 높은 것으로 나타난 0.125% 아가로스겔-0.1% dPLECM 하이드로겔에서 배양 기간에 따른 가슴샘상피세포의 세포 증식능을 비교하기 위하여, 세포를 24-웰 플레이트에서 각각 1, 3, 5, 7, 10, 14일 동안 배양하였다. WST-1 기반 세포독성/증식능 분석을 수행하기 위해 하이드로겔을 96-웰 플레이트로 옮기고, 100 μ L의 배지를 첨가하였으며 모든 조건은 3회 반복하여 측정하였다. 대사적으로 활성화된 세포에서 WST-1과 탈수소효소 반응으로 생성된 포르마잔 염료의 흡광도는 450 nm에서 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 측정하였다.

7. dPLECM 하이드로겔의 세포생존능 평가

dPLECM 하이드로겔의 세포 생존능을 확인하기 위해 calcein AM/ethidium homodimer-1 (EthD-1) Live/Dead viability kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하였다. Calcein AM은 세포 내 에스테라이스 활성에 의해 살아 있는 세포를 염색하고, EthD-1은 세포막 무결성을 잃은 죽은 세포를 염색한다. 시약은 제조업체의 지침에 따라 제조하여, 형광 빛에 노출하기 전 혈청이 없는 배지에서 30분간 배양하였다. 가슴샘상피세포는 0.125% 아가로스겔과 0.125% 아가로스-0.1% dPLECM 하이드로겔에서 3, 5, 7, 10 및 14일 동안 배양된 후 살아있는 세포(녹색)와 죽은 세포(빨간색)의 수를 측정하였다. 형광 이미지는 공초점현미경(FV1000 IX81, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 염색한 후 즉시 획득하였다.

8. dPLECM 하이드로겔의 스페로이드 형성능 평가

가슴샘상피세포를 3×10^3 세포/mL의 세포수가 되도록 두 종류 하이드로겔(0.125% 아가로스겔 및 0.125% 아가로스-0.1% dPLECM 하이드로겔)에서 캡슐화하고, 30 μ L 부피의 하이드로겔로 5% CO₂ 조건의 가슴 인큐베이터에서 37°C로 1, 3, 5, 7, 10 및 14일 동안 배양하였다. 스페로이드의 크기 측정을 위해 위상차 현미경을 사용하여 이미

지를 촬영하였으며, 두 개의 서로 수직인 축의 직경을 측정 후 평균값을 계산하였다. 각 웰당 6개의 구역을 중복되지 않게 지정하였고, 각 구역에서 6개의 스페로이드를 선택하였다. 최종적으로 각 실험군당 총 36개의 스페로이드를 선별하여 크기 측정에 사용하였다.

9. dPLECM 하이드로겔의 스페로이드 형태 및 분포 특성 평가

0.125% 아가로스-0.1% dPLECM 하이드로겔에서 3차원 배양된 가슴샘상피세포 스페로이드의 형태와 하이드로겔 내에서 스페로이드 분포 특성을 관찰하기 위해, 가슴샘상피세포를 1×10^5 세포/mL 농도로 파종하고, 100 μ L 부피의 하이드로겔로 제작한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3, 5, 7일 동안 배양하였다.

배양 3, 5, 7 및 10일째, 0.1 M PBS로 조성한 차가운 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA, Sigma-Aldrich) 용액으로 하이드로겔을 20분간 고정하였다. 고정 후, PBS로 3분씩 3회 세척하고, 0.1% Triton X-100을 PBS에 희석하여 5분간 투과 처리하였으며 PBS로 2회 세척 후, 2% 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich) 용액으로 20분간 처리하여 비특이적 결합을 차단하였다. 그 후, 40배로 희석된 FITC-phalloidin (Promega, Madison, WI, USA)으로 40분간 염색한 후, 1X Tris 완충생리식염수(Tris-buffered saline, TBS)로 세척하고, DAPI를 포함한 Vectashield (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)로 슬라이드에 봉입하였다. 형광 이미지는 공초점레이저주사현미경(LSM900; Carl Zeiss, Jena, Germany)을 통해 관찰하였으며, 1 μ m 간격의 Z-stack 이미지를 통해 3D 스페로이드 구조 및 분포특성을 관찰하였다.

10. dPLECM 하이드로겔에서 배양된 가슴샘상피세포의 유전자 발현 특성 평가

2차원 세포배양, 0.125% 아가로스겔 및 0.125% 아가로스겔-0.1% dPLECM 하이드로겔에서 배양된 가슴샘상피세포에서 주된 가슴샘세포형성촉진인자에 대한 유전자 발현 특성을 비교하기 위하여, 6-웰 플레이트에 가슴샘상피세포를 1×10^5 세포/mL의 농도로 파종하여 5일 동안 배양된 세포로부터 RNA를 추출하였다. RNA 추출은 RNeasy-mini kit (Qiagen Valencia, CA, USA)의 지침을 적절하게 수정하여 사용하였다.

역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 유전자 발현 분석을 위해 cDNA 합성 후 2% 아가로스겔에서 전기영동을 시행

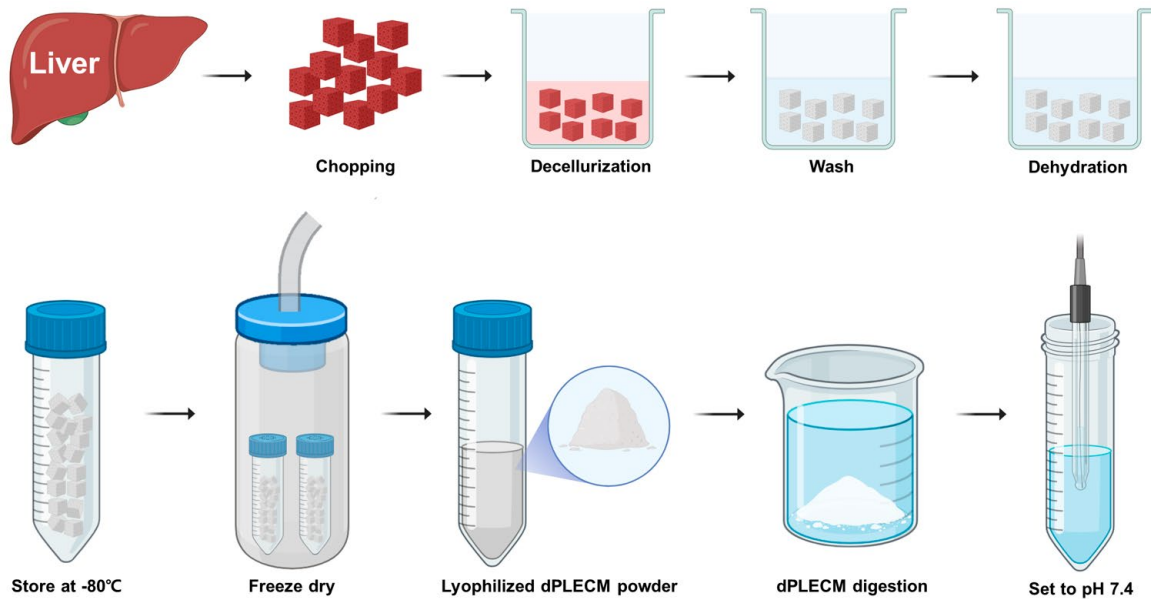


Fig. 1. Schematic diagram of dPLECM preparation methods used in this study.

하여 가슴샘세포형성촉진인자인 과립백혈구-대식세포집락자극인자인 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), T세포의 발달, 생존 및 증식을 촉진하는 인자인 interleukin 7 (IL-7), 그리고 T세포의 분화와 성숙을 유도하는 인자인 thymus and activation-regulated chemokine (TARC) 유전자 발현을 분석하였고 Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 프로그램으로 정량화하여 그래프로 나타내었다. 사용된 프라이머는 다음과 같다. GM-CSF-sense (5'-GTC ACC CGG CCT TGG AAG CAT-3') and GM-CSF-antisense (5'-ACA GTC CGT TTC CGG AGT TGG-3'); IL-7-sense (5'-GCC CTG TCA CAT CAT CTG AGT GCC-3') and IL-7-antisense (5'-CAG GAG GCA TCC AGG AAC TTC TG-3'); TARC-sense (5'-TGC TTC TGG GGA CTT TTC TG-3') and TARC-anti-sense (5'-TGG CCT TCT TCA CAT GTT TG-3') GAPDH-sense (5'-TGG AGA AAC CTG CCA AGT ATG-3') and GAPDH-antisense (5'-TTG TCA TAC CAG GAA ATG AGC-3').

11. 통계분석

모든 정량적 결과는 독립적으로 최소 3회 수행된 실험으로부터 산출하였으며 평균±표준편차(standard deviation)로 표현하였다. 두 군의 비교는 독립표본 t-검정을 이용하여 분석하였으며 p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질의 분리 및 특성 분석

탈세포화 용액으로 최적화 과정을 통해 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질 (decellularized pig liver extracellular matrix, dPLECM)을 얻었으며, 간략한 탈세포화 과정은 Fig. 1에 나타내었다. 간의 탈세포화 정도를 확인하기 위하여 H&E 염색과 DNA 함량의 정량분석을 수행하였다. H&E 염색을 통해 dPLECM에서 거의 모든 핵과 세포질 성분이 관찰되지 않았으며, 주로 콜라겐 섬유만이 풍부하게 남아 있음을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 dPLECM의 DNA 함량은 탈세포화 이전 간 조직의 1.8%로 나타났는데(Fig. 2B), 이는 간 조직의 탈세포화 과정을 통해 대부분의 세포 성분의 제거가 완전하게 이루어졌음을 나타낸다. 이와 같이 돼지 간에서 분리된 섬유가 풍부한 dPLECM은 가슴샘상피세포의 3차원 배양을 위한 지지체로 제작되었다.

2. dPLECM의 가슴샘상피세포 적합성 평가

다양한 농도의 dPLECM을 세포배양 플레이트의 바닥면에 코팅한 후 세포 독성과 증식능을 평가하기 위해, 가슴샘상피세포를 2차원 세포배양 환경에서 0, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.4% 농도의 dPLECM으로 처리한 뒤, WST-1 기반의 세

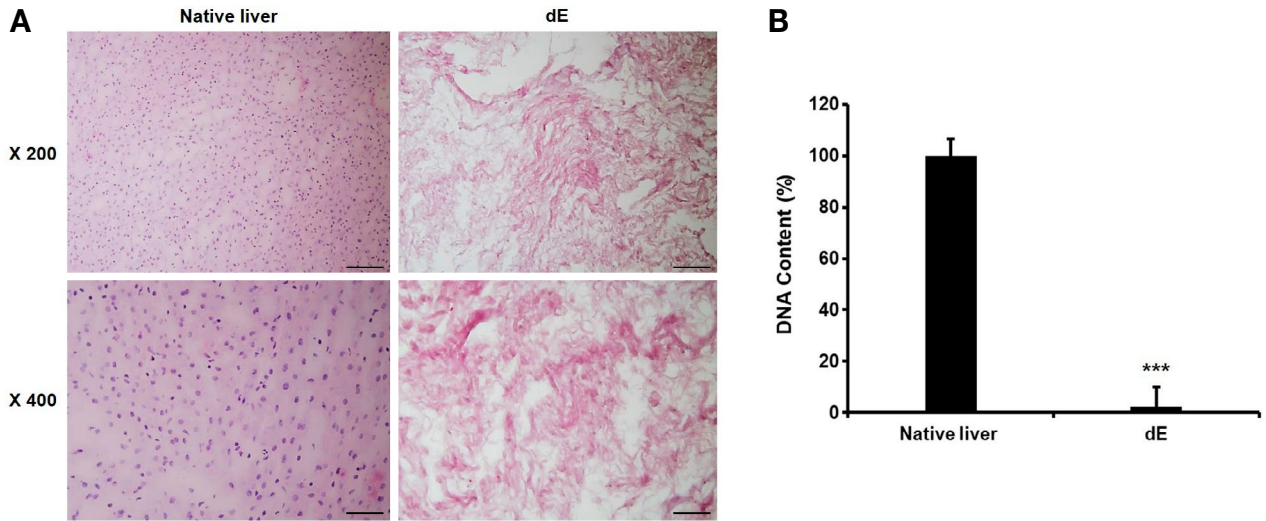


Fig. 2. (A) Representative H&E staining results of native liver tissue and decellularized porcine liver extracellular matrix (dPLECM; dE). Scale bar = 25 μ m (\times 200), 12.5 μ m (\times 200). (B) DNA content analysis of native liver tissue and dPLECM (dE). Data are expressed as relative values compared to the native liver tissue and represent the mean \pm SD of three independent experiments. *** p < 0.001 vs. the native liver tissue group.

포 독성/증식능 분석을 수행하였다. 그 결과, dPLECM의 농도와 처리 시간에 따라 차이는 있었으나, 모든 농도에서 가슴샘상피세포에 대한 독성은 나타나지 않았고 세포의 증식이 증가하는 경향을 보였다. 배양 1일째에는, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.4% dPLECM 농도에서 가슴샘상피세포의 증식률이 대조군 대비 각각 174%, 178%, 174% 및 126%로 증가하였다(Fig. 3). 배양 2일째에는, 0, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.4% dPLECM 농도에서 가슴샘상피세포의 증식률이 배양 1일째 대조군 대비 각각 162%, 213%, 234%, 210% 및 170%로 증가하였다(Fig. 3).

3. dPLECM 기반 하이드로겔에서 3차원 배양한 가슴샘상피세포의 증식능 평가

다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.4%)의 dPLECM과 0.125% 아가로스 복합 하이드로겔을 사용한 가슴샘상피세포의 3차원 배양에서 세포 증식 능력을 평가하기 위해, WST-1 기반의 세포 증식 분석을 수행하였다. 그 결과, 배양 3일째와 5일째 모든 dPLECM 농도에서 0.125% 아가로스 단독 용액에 비해 세포 증식이 증가하였다(Fig. 4). 배양 3일째에는, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 및 0.3% dPLECM 농도에서 가슴샘상피세포의 증식률이 대조군 대비 각각 106%, 134%, 148%, 139%, 129% 및 120%로 증가하였다(Fig. 4). 배양 5일째에는, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 및 0.3% dPLECM 농도에서 가슴샘상피세포의 증식률이 배양 1일째 대조군 대비 각각 154%, 188%, 201%, 217%,

193%, 182% 및 171%로 증가하였다(Fig. 4).

14일 동안 장기간에 걸쳐서 2차원, 3차원 아가로스 (0.125%) 하이드로겔 및 3차원 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔 배양에서 세포 증식 능력을 비교하기 위해, WST-1 기반의 세포 증식 분석을 수행한 결과, 배양 1일째는 각각 100%, 40% 및 59%, 배양 3일째는 각각 186%, 153% 및 195%, 배양 5일째는 각각 285%, 244% 및 312%, 배양 7일째는 각각 279%, 293% 및 326%, 배양 10일째는 각각 153%, 279% 및 334%, 그리고 배양 14일째는 각각 71%, 274% 및 349%의 증식률을 나타내었다(Fig. 5).

4. dPLECM 기반 하이드로겔에서 3차원 배양한 가슴샘상피세포의 생존능 평가

2차원 및 3차원 세포배양에서 dPLECM의 가슴샘상피세포 증식 효과가 가장 높았던 0.1% dPLECM 하이드로겔에서 가슴샘상피세포의 3차원 배양 동안 세포의 생존능을 평가하기 위해, calcein AM/EthD-I 기반의 세포 생존능 분석을 수행하였다. 그 결과, 0.125% 아가로스 하이드로겔에서 배양 7일째부터 스페로이드 내에서 세포 사멸이 나타나기 시작하여 10일째 이후로는 스페로이드를 구성하는 대부분의 세포들이 사멸되었다. 이에 비해 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 복합 하이드로겔에서 배양한 가슴샘상피세포 스페로이드에서는 배양 10일까지는 세포 사멸이 관찰되지 않았으며, 배양 14일째에 일부 세포에서 세포 사멸이 관찰되었다(Fig. 6).

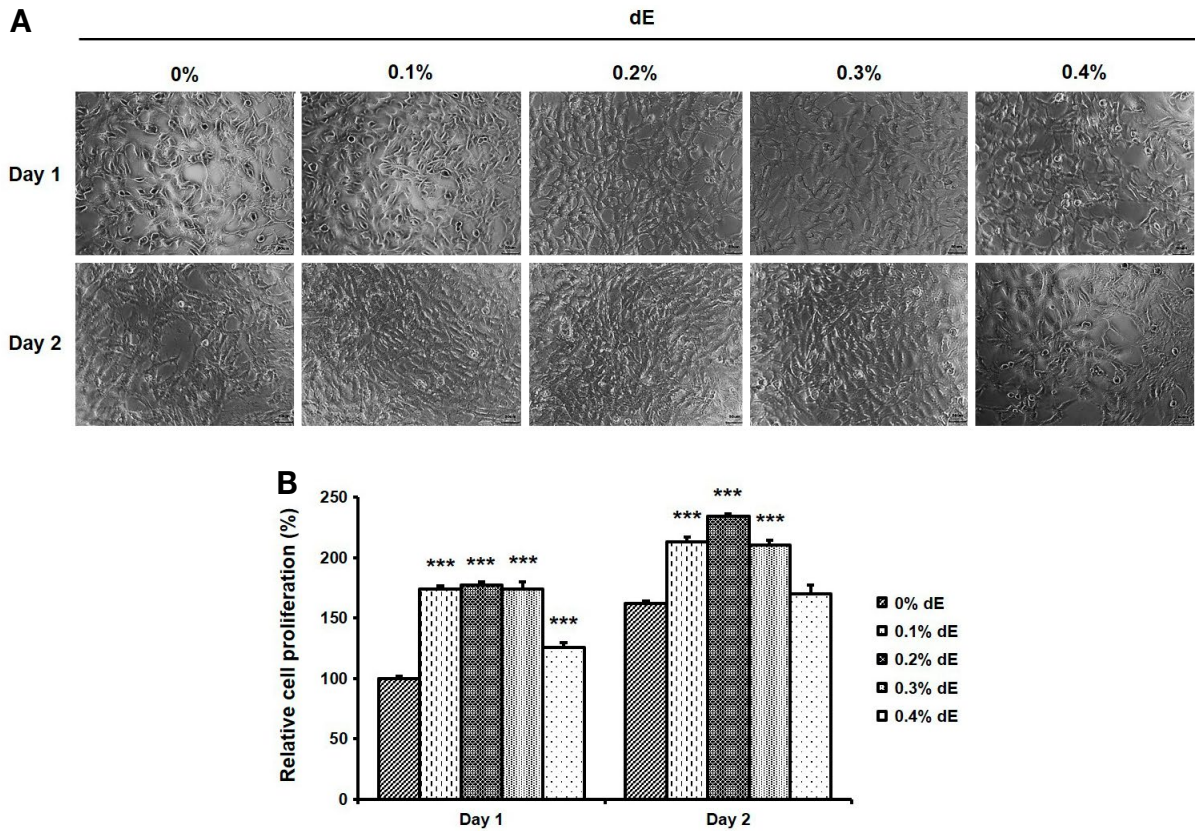


Fig. 3. (A) Representative phase-contrast microscopic images of thymic epithelial cells (TECs) cultured for 1 and 2 days in a 2D cell culture environment after coating the bottom of cell culture plates with dPLECM (dE) at various concentrations (0%, 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4%) to evaluate cell compatibility. Scale bars = 50 μ m. (B) Bar graphs showing TEC proliferation, assessed using the WST-1 assay, after 1 and 2 days of culture in a 2D environment with dE-coated plates (0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, and 0.4%). Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *** p < 0.001 vs. the 0% dE control group.

5. dPLECM 기반 하이드로겔에서 3차원 배양한 가슴샘상피세포의 스페로이드 형성능 평가

스페로이드 형성과 성장에 미치는 dPLECM의 효과를 평가하기 위해, 14일 동안 0.125% 아가로스 및 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔에서 3차원 배양을 시행한 후 스페로이드의 크기를 측정된 결과, 배양 14일째 스페로이드의 평균 직경이 0.125% 아가로스 하이드로겔의 경우 64 μ m이었고 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔의 경우 81 μ m이었다(Fig. 7). 배양 1일째 0.125% 아가로스 하이드로겔에서 배양한 스페로이드의 평균 직경에 대한 상대적인 크기를 비교하였을 때, 배양 3일째는 각각 100% 및 111%, 배양 5일째는 각각 142% 및 193%, 배양 7일째는 각각 176% 및 263%, 배양 10일째는 각각 206% 및 285%, 그리고 배양 14일째는 각각 224% 및 309%에 해당하는 스페로이드 크기를 보여주었다(Fig. 7).

6. dPLECM 기반 하이드로겔에서 3차원 배양한 가슴샘상피세포 스페로이드의 형태 및 분포 특성 평가

스페로이드의 형태와 분포 특성에 미치는 dPLECM의 효과를 평가하기 위해, 3, 5 및 7일 동안 0.125% 아가로스 및 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔에서 3차원 배양된 스페로이드에 대해 DAPI/F-actin 염색을 시행한 후 공초점현미경으로 관찰한 결과, 모든 하이드로겔에서 다세포 스페로이드가 매끄러운 윤곽을 가진 구형의 모양을 이루었으며, 스페로이드 내에서 세포 사이 긴밀한 접촉을 보이며 잘 조직화된 구조를 나타내었다(Fig. 8). 또한 공초점현미경을 통해 Z-stack 및 재구성된 3D 투영 이미지를 얻어 관찰한 결과, 배양 3일째의 경우 0.125% 아가로스 하이드로겔에서는 28 μ m, 그리고 0.1% DPLECM 하이드로겔에서는 44 μ m 깊이까지 스페로이드가 분포하였다(Fig. 8). 배양 5일째의 경우 0.125% 아가로스 하이드로겔에서는 36 μ m 그리고 0.1% DPLECM 하이드로겔에서

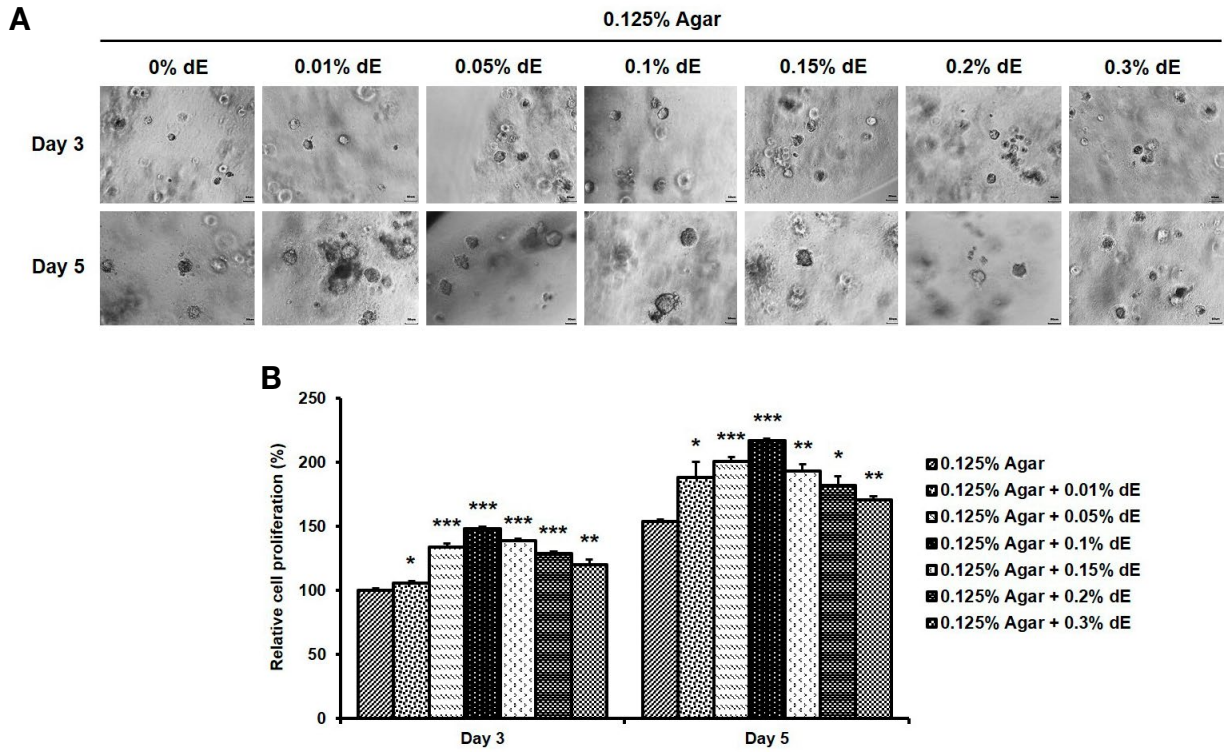


Fig. 4. (A) Representative phase-contrast microscopic images of thymic epithelial cells (TECs) cultured for 3 and 5 days in different 3D hydrogel scaffolds: 0.125% agarose (Agar), 0.125% Agar-0.01% dPLECM (dE), 0.125% Agar-0.05% dE, 0.125% Agar-0.1% dE, 0.125% Agar-0.15% dE, 0.125% Agar-0.2% dE, and 0.125% Agar-0.3% dE. Scale bars = 50 μ m. (B) Bar graphs showing TEC proliferation, assessed using the WST-1 assay, after 3 and 5 days of culture in the same hydrogel scaffolds as in (A). Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. the 0.125% Agar (control) group.

는 58 μ m 깊이까지 스페로이드가 분포하였다(Fig. 8). 배양 7일째의 경우 0.125% 아가로스 하이드로겔에서는 50 μ m 그리고 0.1% DPLECM 하이드로겔에서는 80 μ m 깊이까지 스페로이드가 분포하였다(Fig. 8).

7. dPLECM 기반 하이드로겔에서 3차원 배양한 가슴샘상피세포의 기능적 특성 평가

가슴샘상피세포를 5일 동안 2차원, 3차원 아가로스 (0.125%) 하이드로겔 및 3차원 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔에서 배양을 시행한 후 가슴샘상피세포의 기능과 관련된 핵심적인 유전자의 발현을 RT-PCR 분석을 통해 관찰한 결과, GM-CSF 유전자의 경우 2차원 배양된 세포에 비해 아가로스(0.125%) 및 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔에서 3차원 배양된 세포에서 각각 241% 및 422% 증가하였으며, IL-7 유전자의 경우 2차원 배양된 세포에 비해 아가로스(0.125%) 및 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔에서 3차원 배양된 세포에서 각각 308% 및 829% 증가하였으며, 그리

고 TARC 유전자의 경우 2차원 배양된 세포에 비해 아가로스(0.125%) 및 0.1% dPLECM-0.125% 아가로스 하이드로겔에서 3차원 배양된 세포에서 각각 569% 및 669% 증가하였다(Fig. 9).

고찰

가슴샘상피세포는 가슴샘에서 3차원 구조를 형성하며, T세포 발달을 위한 미세환경을 제공한다. 이 과정에서 가슴샘상피세포와 가슴샘세포 사이의 상호작용은 T세포의 적절한 발달과 선택에 필수적이다[16,17]. 그러나 기존의 2차원 세포배양 시스템에서는 가슴샘상피세포의 기능이 제한되어 효과적인 T세포 발달을 유도하지 못하며, 생체 가슴샘상피세포의 특성을 재현하기 위해 3차원 배양 기술이 필수적이다[16-19].

생체 특성을 반영한 가슴샘상피세포 배양을 위한 새로운 접근법 개발은 주요 과제로 대두되고 있다. 이러한 점에서 가슴샘상피세포의 3차원 배양법이 많은 연구자들

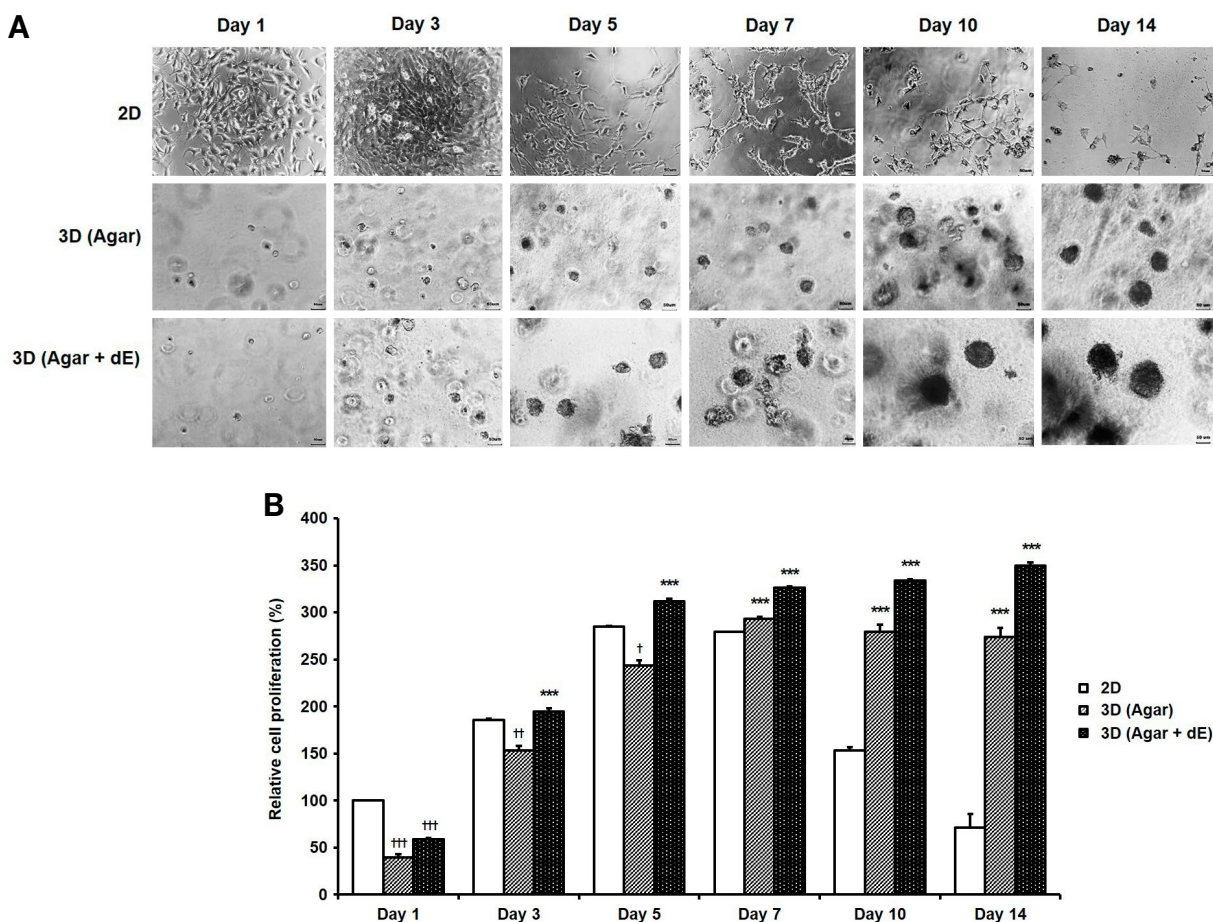


Fig. 5. (A) Representative phase-contrast microscopic images of thymic epithelial cells (TECs) cultured for 1, 3, 5, 7, 10, and 14 days in 2D cell culture conditions and in different 3D hydrogel scaffolds: 0.125% agarose (Agar) and 0.125% Agar-0.1% dPLECM (dE). Scale bars = 50 μ m. (B) Bar graphs showing TEC proliferation under the same conditions as in (A), assessed using the WST-1 assay. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *** p < 0.001 for significant increases, and † p < 0.05, †† p < 0.05, ††† p < 0.001 for significant decreases vs. the 0.125% Agar (control) group.

에 의해 주목을 받고 있지만, 아직 이상적인 3차원 세포배양 방법은 정립되지 않은 상황이다[21-34]. 이전의 연구에서 본 연구의 저자들은 전기방사로 제작된 생리활성 생선콜라겐/폴리카프로락톤 복합 나노섬유 지지체를 이용하여 가슴샘상피세포 3차원 배양 모델을 구축하였고, 이를 통해 가슴샘상피세포의 부착, 증식, 활성이 증진됨을 증명하였다[21]. 이 외에도 젤라틴 기반 하이드로겔[22], 3차원 microgel [30] 및 fibronectin으로 기능화된 섬유그물 (fibrous mesh) [26] 등의 지지체가 가슴샘상피세포 배양 및 가슴샘세포와의 상호작용을 촉진하는 것으로 보고되었다. 또한, 다공성 실크 이중층 지지체에서 가슴샘상피세포를 3차원 배양한 결과 증식과 대사활동이 증가하였으며[35], laminin-2가 고정된 3차원 섬유 구조는 가슴샘결절상피세포의 활성과 가슴샘세포와의 상호작용을 향상시켰다[28].

Silva 등[27]은 생체재료 및 유전자 조작을 이용한 새로운 가슴샘상피세포 증폭 전략을 설계하였으며, 최근에는 인공 가슴샘 오가노이드(organoid)가 개발되었으나, 완전한 기능적 가슴샘 재구성에는 한계가 있었다[23-25,31,32].

현재까지 수행된 대부분의 연구에서는 인간 또는 마우스 혈구줄기세포(hematopoietic stem cell)와 Notch 리간드를 발현하는 마우스 골수 유래 버팀질세포주를 결합하여 3차원 세포 집합체 형태의 인공 가슴샘 오가노이드 (artificial thymic organoid)를 제작하였으나, 이러한 모델은 버팀질세포가 가슴샘이 아닌 골수에서 유래하였을 뿐만 아니라 생체 가슴샘과 같은 버팀질세포의 3차원 구조를 재현하지 못한 한계가 있다[23-25]. 최근 연구에서는 3차원 피브린 기반 하이드로겔을 사용한 유도만능줄기세포 (induced pluripotent stem cell) 유래 가슴샘 오가노이드 제

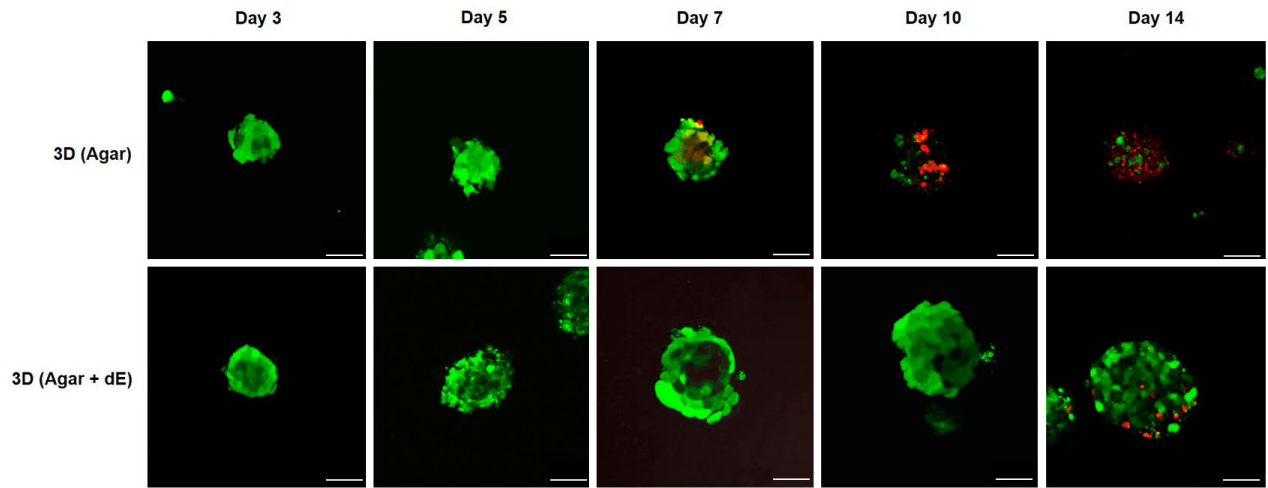


Fig. 6. Representative fluorescence microscopic image (400× magnification) of 3D-cultured thymic epithelial cells in 0.125% agarose (Agar) and 0.125% Agar-0.1% dPLECM (dE) hydrogel scaffolds on days 3, 5, 7, 10, and 14, as determined using the live-dead cell viability assay (green: calcein for live cells; red: ethidium homodimer-I, EthD-I, for dead cells). Scale bars = 50 μm.

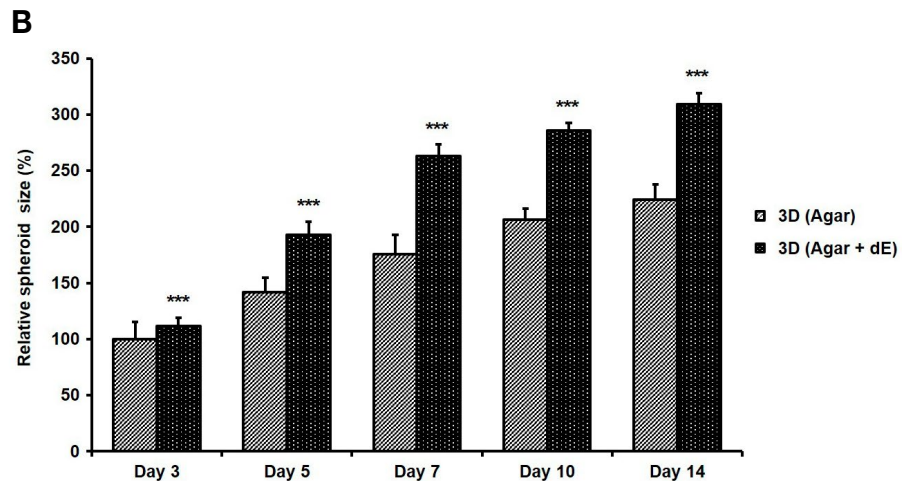
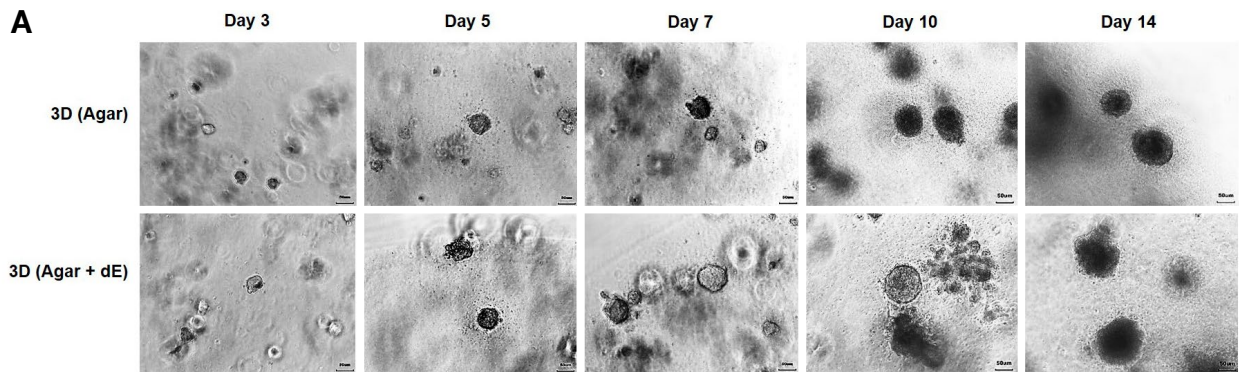


Fig. 7. (A) Representative phase-contrast microscopic images of thymic epithelial cells (TECs) cultured for 3, 5, 7, 10, and 14 days in 3D hydrogel scaffolds: 0.125% agarose (Agar) and 0.125% Agar-0.1% dPLECM (dE). Scale bars = 50 μm. (B) Bar graphs showing the mean diameters of TEC spheroids generated under the same conditions as in (A), as measured from phase-contrast microscopic images. Data represent the mean ± SD of three independent experiments. ***p < 0.001 vs. the 0.125% Agar group.

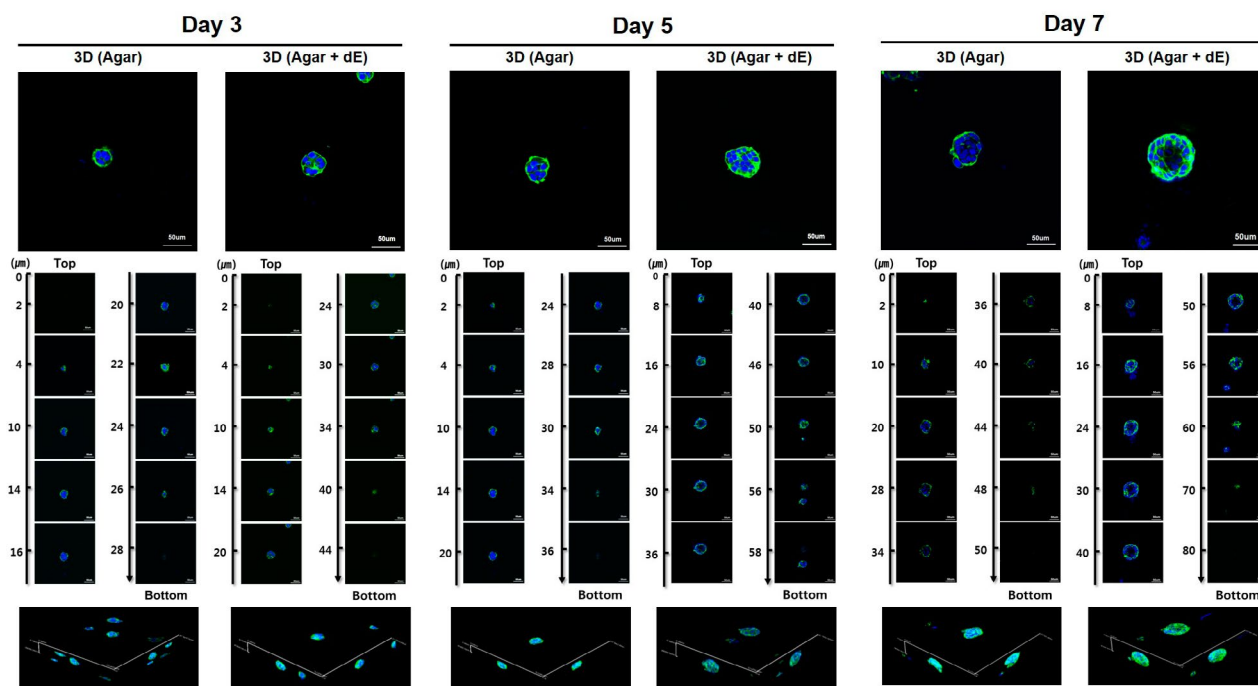


Fig. 8. Confocal microscopic images of thymic epithelial cell-derived spheroids cultured in 3D hydrogel scaffolds: 0.125% agarose (Agar) and 0.125% Agar-0.1% dPLECM (dE). Fluorescence images of F-actin-stained spheroids show differences in cell morphology and spatial distribution between the two hydrogel conditions. Representative optical sections and a Z-projection image of F-actin-stained spheroids are shown. Scale bars = 50 μm .

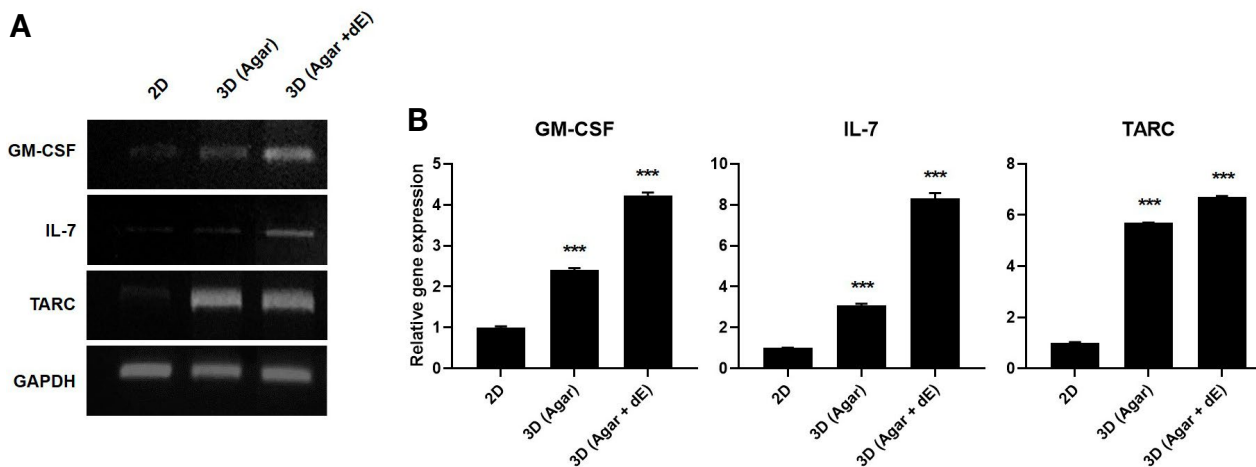


Fig. 9. (A) Effect of 0.125% Agar-0.1% dPLECM (dE) hydrogel scaffolds on the gene expression of key thymopoietic factors, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-7, and thymus activation-regulated chemokine (TARC)-in thymic epithelial cells cultured in 2D and 3D systems (0.125% agarose (Agar) and 0.125% Agar-0.1% dE), as measured by RT-PCR. (B) Bar graphs showing the densitometric quantification of mRNA expression normalized to GAPDH. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$ vs. the 2D-cultured group.

작을 통해 가슴샘 미세환경을 재현함으로써 가슴샘상피세포 생물학 및 T세포 생성 연구에 유용하게 활용될 수 있는 가능성을 보여주었으나, 아직 구조적, 기능적 특성 분석에

대한 추가 연구가 필요한 상황이다[31]. 또한, Lim 등[32]은 성체 가슴샘상피세포를 이용해 이전보다 기능이 크게 향상된 인공 가슴샘 오가노이드 제작 기술을 개발하였지

만, 방법이 매우 복잡하고 기술적인 난이도가 높아 더 용이한 제작 기술 개발이 필요하다고 생각된다.

하이드로겔 지지체는 3차원 배양 및 조직공학에서 유용하나, 생물활성 인자가 결핍되어 있는 단점이 있다. 이에 비해, dECM 지지체는 다양한 ECM 성분과 성장 인자를 포함하여 중요한 장점을 가진다[11,12,14]. dECM은 높은 생체적합성과 구조적·생화학적 보존성을 가지며, 이 독특한 특성 덕분에 종(species)을 초월하여 다양한 세포의 성장을 효과적으로 촉진하는 것으로 알려져 있다[11,13,36,37]. ECM은 주로 구조 단백질(예: 콜라겐, 탄력소), 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan) 및 신호 분자로 구성되어 있다. 이러한 구성 요소는 종 간 높은 보존성을 보이며, 이를 통해 dECM은 세포 행동을 유도하는 기계적·공간적 신호를 제공하고 면역 거부 반응 가능성을 줄이는 것으로 보고되어 있다[11,13,36,37]. 또한 탈세포화 과정은 성장 인자와 접착 분자(예: 피브로넥틴, 라미닌)와 같은 생체활성 분자를 보존하여 세포 부착, 이동, 증식, 분화를 촉진하는 역할을 한다[38]. dECM은 다양한 종(예: 사람, 설치류, 대형 동물)의 세포배양에 성공적으로 활용되었으며, 한 종의 세포(예: 사람)가 다른 종의 스캐폴드(예: 돼지, 소 등)에서 배양된 사례를 통해 종 간 호환성이 입증되었다[39]. 따라서, dECM은 구조적, 생화학적, 기계적 특성을 활용하여 다양한 종의 세포 성장과 기능적 활성을 증진하는 범용성 플랫폼으로 작용할 수 있다.

가슴샘 유래 dECM은 가슴샘상피세포 배양 및 가슴샘 세포 생성을 지지하는 유망한 연구 대상으로 주목받고 있다[33,34]. 본 연구에서는 가슴샘 유래 dECM에 비해 확보하기 용이한 돼지 간 유래 dECM인 dPLECM 하이드로겔을 이용한 가슴샘상피세포의 3차원 배양 방법을 탐구하였다. 본 연구에서 Triton X-100/황산도데실나트륨 기반 탈세포화 프로토콜로 제작된 dPLECM은 세포 성분을 효과적으로 제거하면서 세포바깥바탕질 성분을 보존하였음을 확인하였다. H&E 염색 결과, 대부분의 핵과 세포 성분이 제거되었으며, DNA 함량 분석에서 핵 성분이 98.2% 감소하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 dPLECM이 가슴샘상피세포 3차원 배양을 위한 이상적인 지지체로 활용될 가능성을 시사한다. 본 연구의 결과와 유사하게 dPLECM은 간의 미세환경을 효과적으로 재현할 수 있으며, 생체모사 3차원 간세포 배양뿐만 아니라 섬유모세포, 중간엽줄기세포, 지방세포 등 다양한 세포의 3차원 배양에 활용 가능한 세포 지지체로 작용함이 밝혀졌다[40-42].

본 연구에서 0.1% dPLECM 기반 하이드로겔 지지체에서 가슴샘상피세포를 배양한 결과, 세포 적합성이 유의하

게 증가하였다. 이는 기존의 아가로스 기반 지지체와 비교하여, 0.1% dPLECM이 가슴샘상피세포의 생존 및 성장을 더욱 효과적으로 증진시킴을 나타낸다. dECM이 세포 적합성을 증가시키는 현상은 다른 세포 유형에서도 보고된 바 있다[43-45]. 예를 들어, dECM 기반 지지체는 중간엽 줄기세포의 증식을 촉진하고 뼈생성 분화를 유도하여 골수 미세환경의 복제를 가능하게 하였다[43].

세포바깥바탕질의 양은 가슴샘상피세포의 표현형에 영향을 미치며, 세포바깥바탕질의 양이 많을수록 가슴샘상피세포 전구 세포의 분화가 증가한다는 연구 결과가 보고된 바 있다[33]. 그러나 세포바깥바탕질의 높은 농도는 가슴샘상피세포의 대사 활동과 세포 증식을 억제할 수 있으며, 이러한 현상은 Silva 등[29]의 연구에서도 관찰되었다. 본 연구에서도 2차원 세포배양에서 0.1%~0.3% dPLECM이 세포의 증식을 유의하게 증가시켰지만 0.4% dPLECM에서는 0.1%~0.3% dPLECM에 비해 세포 증식 효과가 감소하였다. 또한 3차원 세포배양에서 0.01%, 0.05% 및 0.1% dPLECM은 농도 의존적으로 세포의 증식을 유의하게 증가시켰다. 하지만 이러한 3차원 세포 증식 효과는 0.1% dPLECM에서 최대에 이르렀고 그 후 0.1%~0.3% dPLECM은 농도가 증가할수록 점점 세포 증식 효과가 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구를 통해 0.1% dPLECM이 가슴샘상피세포의 3차원 배양에서 세포의 증식에 가장 효과적인 농도임을 증명하였다. 세포바깥바탕질 농도의 증가는 세포 증식 능력 증가와 항상 직접적으로 연관되지 않으며, 이는 다양한 세포 유형 및 ECM 구성 단백질 조성에 대한 여러 연구에서 확인된 바 있다[46-49].

또한, 본 연구에서 0.1% dPLECM 기반 하이드로겔은 2차원 세포배양 및 dPLECM이 포함되지 않은 아가로스 하이드로겔 기반 3차원 배양에 비해, 가슴샘상피세포의 생존율과 주된 가슴샘세포형성 촉진 인자인 GM-CSF, IL-7 및 TARC의 발현을 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과는 Jiang 등[50]의 연구에서 dPLECM 기반 환경에서 배양된 HepG2 세포의 vinculin과 Ki67 발현이 높게 나타난 결과와 유사하다. 이는 dPLECM이 세포 생존과 성장을 촉진하고, 이를 통해 세포 표현형 변화를 유도할 수 있음을 시사한다.

이러한 결과는 dPLECM이 가슴샘상피세포 배양을 위한 바탕질로서 높은 잠재력을 가짐을 입증한다. 결론적으로, 본 연구에서는 돼지 간 유래 세포바깥바탕질을 Triton X-100/황산도데실나트륨 기반 탈세포화 프로토콜을 통해 효과적으로 제조할 수 있음을 확인하였으며, 이를 활용하여 가슴샘상피세포의 3차원 배양에 적합한 지지체를 제작

하기 위한 간단하면서도 효율적인 접근법을 제시하였다. 제작된 dPLECM은 가슴샘상피세포의 생존과 성장을 촉진하며, 가슴샘세포형성 관련 활동을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구의 결과는 dPLECM 기반 하이드로겔이 가슴샘상피세포 배양, T세포 발달, 가슴샘 오가노이드 바이오프린팅, 가슴샘 재생 및 가슴샘 조직공학 분야에서 유망한 응용 가능성을 지님을 강력히 뒷받침한다.

REFERENCES

- Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011;21:745-54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>.
- Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med.* 2009;4:2. <https://doi.org/10.1186/1747-5341-4-2>.
- Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103:655-63. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>.
- Yin X, Mead BE, Safaei H, Langer R, Karp JM, Levy O. Engineering stem cell organoids. *Cell Stem Cell.* 2016;18:25-38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>.
- Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell.* 2007;130:601-10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006>.
- Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001;294:1708-12. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>.
- Belfiore L, Aghaei B, Law AMK, Dobrowolski JC, Raftery LJ, Tjandra AD, et al. Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery. *Eur J Pharm Sci.* 2021;163:105876. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105876>.
- Yoo S, Lee HJ. Spheroid-Hydrogel-Integrated biomimetic system: A new frontier in advanced three-dimensional cell culture technology. *Cells Tissues Organs.* 2024;12:1-20. <https://doi.org/10.1159/000541416>.
- Fan D, Stauffer U, Accardo A. Engineered 3D polymer and hydrogel microenvironments for cell culture applications. *Bioengineering (Basel).* 2019;6:113. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6040113>.
- Uriel S, Labay E, Francis-Sedlak M, Moya ML, Weichselbaum RR, Ervin N, et al. Extraction and assembly of tissue-derived gels for cell culture and tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15:309-21. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0309>.
- Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater.* 2021;10:15-31. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.014>.
- Golebiowska AA, Intravaia JT, Sathe VM, Kumbar SG, Nukavarapu SP. Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects. *Bioact Mater.* 2023;32:98-123. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.09.017>.
- Brouki Milan P, Masoumi F, Biazar E, Zare Jalise S, Mehrabi A. Exploiting the potential of decellularized extracellular matrix (ECM) in tissue engineering: a review study. *Macromol Biosci.* 2024;e2400322. <https://doi.org/10.1002/mabi.202400322>.
- Li C, An N, Song Q, Hu Y, Yin W, Wang Q, et al. Enhancing organoid culture: harnessing the potential of decellularized extracellular matrix hydrogels for mimicking microenvironments. *J Biomed Sci.* 2024;31:96. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01086-7>.
- Mittelbrunn M, Kroemer G. Hallmarks of T cell aging. *Nat Immunol.* 2021;22:687-98. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00927-z>.
- Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol.* 2012;33:256-63.
- Wang HX, Pan W, Zheng L, Zhong XP, Tan L, Liang Z, et al. Thymic epithelial cells contribute to thymopoiesis and T cell development. *Front Immunol.* 2020;10:3099. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03099>. Erratum in: *Front Immunol.* 2020;11:628464. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.628464>.
- van Ewijk W, Wang B, Hollander G, Kawamoto H, Spanopoulou E, Itoi M, et al. Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin Immunol.* 1999;11:57-64. <https://doi.org/10.1006/smim.1998.0158>.
- Mohtashami M, Zuniga-Pflucker JC. Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J Immunol.* 2006;176:730-4. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.2.730>.
- Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity.* 2002;17:749-56.
- Choi DJ, Choi SM, Kang HY, Min HJ, Lee R, Ikram M, et al. Bioactive fish collagen/polycaprolactone composite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for 3D cell culture. *J Biotechnol.* 2015;205:47-58. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.017>.
- Truong VX, Hun ML, Li F, Chidgey AP, Forsythe JS. In situ-forming click-crosslinked gelatin based hydrogels for 3D culture of thymic epithelial cells. *Biomater Sci.* 2016;4:1123-

31. <https://doi.org/10.1039/c6bm00254d>.
23. Seet CS, He C, Bethune MT, Li S, Chick B, Gschwend EH, et al. Generation of mature T cells from human hematopoietic stem and progenitor cells in artificial thymic organoids. *Nat. Methods* 2017;14:521-30.
24. Montel-Hagen A, Seet CS, Li S, Chick B, Zhu Y, Chang P, et al. Organoid-Induced differentiation of conventional T cells from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2019;24:376-89.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.011>.
25. Montel-Hagen A, Sun V, Casero D, Tsai S, Zampieri A, Jackson N, et al. In vitro recapitulation of murine thymopoiesis from single hematopoietic stem cells. *Cell Rep*. 2020;33:108320. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108320>.
26. Silva CS, Pinto RD, Amorim S, Pires RA, Correia-Neves M, Reis RL, et al. Fibronectin-functionalized fibrous meshes as a substrate to support cultures of thymic epithelial cells. *Biomacromolecules*. 2020;21:4771-80. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00933>.
27. Silva CS, Reis RL, Martins A, Neves NM. Recapitulation of thymic function by tissue engineering strategies. *Adv Healthc Mater*. 2021;10:e2100773. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100773>.
28. Silva CS, Cerqueira MT, Reis RL, Martins A, Neves NM. Laminin-2 immobilized on a 3D fibrous structure impacts cortical thymic epithelial cells behaviour and their interaction with thymocytes. *Int J Biol Macromol*. 2022;222:3168-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.089>.
29. Silva CS, Pinto RD, Pires RA, Correia-Neves M, Reis RL, Alves NL, et al. The influence of feeder cell-derived extracellular matrix density on thymic epithelial cell culture. *ACS Biomater Sci Eng*. 2023;9:2514-23. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.3c00148>.
30. Suraiya AB, Hun ML, Truong VX, Forsythe JS, Chidgey AP. Gelatin-based 3D microgels for in vitro T lineage cell generation. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6:2198-208. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b01610>.
31. d'Arco M, Provin N, Maminirina P, Baron O, Guillonneau C, David L, et al. Formation of human thymus organoids in three-dimensional fibrin hydrogels. *J Vis Exp*. 2024;212. <https://doi.org/10.3791/66795>.
32. Lim S, J F van Son G, Wisma Eka Yanti NL, Andersson-Rolf A, Willemsen S, Korving J, et al. Derivation of functional thymic epithelial organoid lines from adult murine thymus. *Cell Rep*. 2024;43:114019. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114019>.
33. Hun M, Barsanti M, Wong K, Ramshaw J, Werkmeister J, Chidgey AP. Native thymic extracellular matrix improves in vivo thymic organoid T cell output, and drives in vitro thymic epithelial cell differentiation. *Biomaterials*. 2017;118:1-15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.054>.
34. Asnaghi MA, Barthlott T, Gullotta F, Strusi V, Amovilli A, Hafen K, et al. Thymus extracellular matrix-derived scaffolds support graft-resident thymopoiesis and long-term in vitro culture of adult thymic epithelial cells. *Adv Funct Mater*. 2021;31:2010747. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010747>.
35. Silva CS, Kundu B, Gomes JM, Fernandes EM, Reis RL, Kundu SC, et al. Development of bilayered porous silk scaffolds for thymus bioengineering. *Biomater Adv*. 2023;147:213320. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213320>.
36. Kasravi M, Ahmadi A, Babajani A, Mazloomnejad R, Hatamnejad MR, Shariatzadeh S, et al. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomater Res*. 2023;27:10. <https://doi.org/10.1186/s40824-023-00348-z>.
37. Liang C, Liao L, Tian W. Advances focusing on the application of decellularized extracellular matrix in periodontal regeneration. *Biomolecules*. 2023;13:673. <https://doi.org/10.3390/biom13040673>.
38. Bejleri D, Davis ME. Decellularized extracellular matrix materials for cardiac repair and regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2019;8:e1801217. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801217>.
39. Neishabouri A, Soltani Khaboushan A, Daghigh F, Kajibafzadeh AM, Majidi Zolbin M. Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: evaluation, modification, and application methods. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:805299. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299>.
40. Bao J, Wu Q, Wang Y, Li Y, Li L, Chen F, et al. Enhanced hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in spheroidal aggregate culture on a decellularized liver scaffold. *Int J Mol Med*. 2016;38:457-65. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2638>.
41. Xu J, Yang S, Su Y, Hu X, Xi Y, Cheng YY, et al. A 3D bio-printed tumor model fabricated with gelatin/sodium alginate/decellularized extracellular matrix bioink. *Int J Bioprint*. 2022;9:630. <https://doi.org/10.18063/ijb.v9i1.630>.
42. Milton LA, Davern JW, Hipwood L, Chaves JCS, McGovern J, Broszczak D, et al. Liver click dECM hydrogels for engineering hepatic microenvironments. *Acta Biomater*. 2024;185:144-160. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.06.037>.
43. Antebi B, Zhang Z, Wang Y, Lu Z, Chen XD, Ling J. Stromal-cell-derived extracellular matrix promotes the proliferation and retains the osteogenic differentiation capacity of mesenchymal stem cells on three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21:171-81. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0092>.

44. Jeon H, Lee J, Lee H, Kim GH. Nanostructured surface of electrospun PCL/dECM fibres treated with oxygen plasma for tissue engineering. *RSC Adv.* 2016;6:32887-96.
45. Kim B, Ventura R, Lee BT. Functionalization of porous BCP scaffold by generating cell-derived extracellular matrix from rat bone marrow stem cells culture for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12:e1256-67. <https://doi.org/10.1002/term.2529>.
46. Edgar LT, Underwood CJ, Guilkey JE, Hoying JB, Weiss JA. Extracellular matrix density regulates the rate of neovessel growth and branching in sprouting angiogenesis. *PLoS One.* 2014;9:e85178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085178>.
47. Faia-Torres AB, Goren T, Ihalainen TO, Guimond-Lischer S, Charnley M, Rottmar M, et al. Regulation of human mesenchymal stem cell osteogenesis by specific surface density of fibronectin: a gradient study. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:2367-75. <https://doi.org/10.1021/am506951c>.
48. Sousa RO, Alves AL, Carvalho DN, Martins E, Oliveira C, Silva TH, et al. Acid and enzymatic extraction of collagen from Atlantic cod (*Gadus Morhua*) swim bladders envisaging health-related applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2020;31:20-37. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1669313>.
49. Subhan F, Kang HY, Lim Y, Ikram M, Baek SY, Jin S, et al. Fish scale collagen peptides protect against CoCl₂/TNF- α -induced cytotoxicity and inflammation via inhibition of ROS, MAPK, and NF- κ B pathways in HaCaT cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9703609. <https://doi.org/10.1155/2017/9703609>.
50. Jiang Y, Jin L, Liu W, Liu H, Liu X, Tan Z. Construction of 3D tumor in vitro models with an immune microenvironment exhibiting similar tumor properties and biomimetic physiological functionality. *Biomater Sci.* 2024;13:223-35. <https://doi.org/10.1039/d4bm00754a>.

간추림 : 가슴샘상피세포(thymic epithelial cell)는 가슴샘의 주요 기질 구성 요소로서 스펀지 형태의 3차원 구조를 형성하며, T세포 발달에 필요한 미세환경을 제공한다. 2차원 세포배양 시스템에서는 가슴샘상피세포의 주요 분자 인자 발현이 감소하여 효과적인 T세포 발달을 유도하지 못한다. 이에 비해 3차원 가슴샘상피세포 배양은 세포가 구조화된 지지체 내에서 성장하면서 이웃 세포 및 세포바깥바탕질과 상호작용할 수 있도록 하여 생체 내 환경을 보다 정밀하게 모사하며, 세포의 성장과 기능을 촉진할 수 있다. 3차원 세포배양 기술 구현을 위해서는 생체 세포바깥바탕질의 구조적 및 생화학적 특성을 재현할 수 있는 지지체가 필수적이다. 탈세포화 세포바깥바탕질 기반 하이드로겔은 추가적인 생물학적 인자 없이도 증식, 이동, 분화와 같은 다양한 세포 활동을 지지하여 조직공학 응용에 이상적인 소재로 간주된다. 본 연구에서는 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질을 이용하여 가슴샘상피세포의 3차원 배양을 지지하는 자가 겔화 하이드로겔을 개발하였다. 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질기반 하이드로겔에서 배양된 가슴샘상피세포는 3D 아가로스 하이드로겔 또는 기존 2D 시스템에서 배양된 가슴샘상피세포와 비교하여 독특한 세포 특성과 분자적 특성을 나타내었다. 특히 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질기반 하이드로겔에서 3차원 배양된 가슴샘상피세포는 세포의 증식, 생존, 스펀로이드 형성, 생존율, 침습성 및 활성이 증가하였다. 또한 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질기반 하이드로겔에서 3차원 배양된 가슴샘상피세포에서는 GM-CSF, IL-7, TARC와 같은 중요한 가슴샘세포생성인자들의 발현이 증가하였다. 이러한 연구 결과는 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질기반 하이드로겔을 활용한 가슴샘상피세포의 효율적인 3D 배양 모델을 제시하고, 가슴샘상피세포의 3차원 배양에 대한 이해를 증진시킬 뿐만 아니라 돼지 간 유래 탈세포화 세포바깥바탕질 하이드로겔이 T세포 발달, 가슴샘 오가노이드 바이오프린팅 및 가슴샘 재생 분야에서 유망한 응용 가능성을 지니고 있음을 시사한다.

찾아보기 낱말 : 가슴샘상피세포, 탈세포화 세포바깥바탕질, 하이드로겔, 3차원 세포배양