



등록특허 10-2571223



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월29일  
(11) 등록번호 10-2571223  
(24) 등록일자 2023년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/078 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0651 (2013.01)  
C12N 5/0668 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2021-0083792  
(22) 출원일자 2021년06월28일  
심사청구일자 2021년06월28일  
(65) 공개번호 10-2022-0043010  
(43) 공개일자 2022년04월05일  
(30) 우선권주장  
1020200125599 2020년09월28일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020190007700 A  
W02019122388 A1

(73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
임재열  
서울특별시 강남구 언주로63길 20, 연세대학교 의과대학 미래의학연구센터 202호(역삼동)  
김동현  
서울특별시 서대문구 독립문로 62-6, 203호(냉천동)  
(74) 대리인  
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 6 항

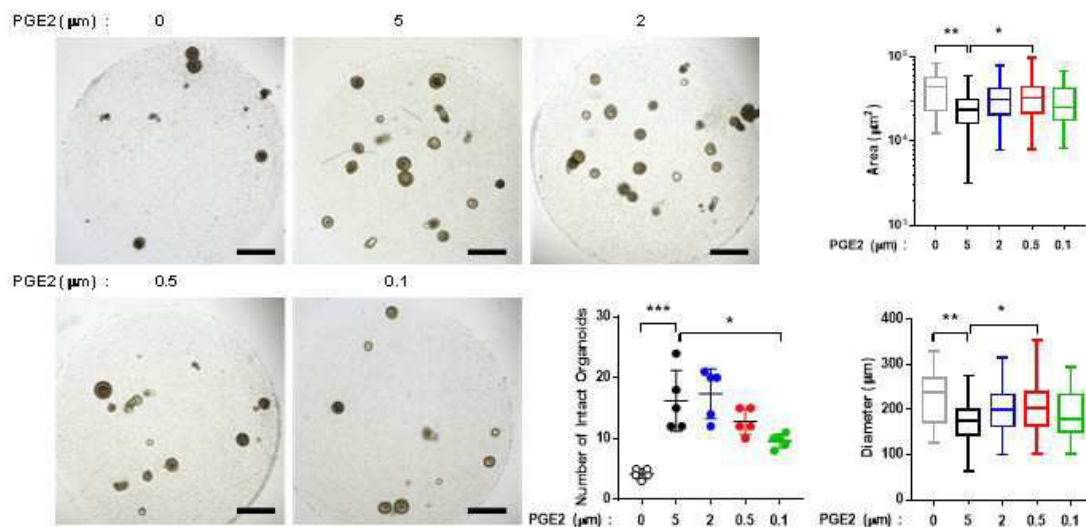
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 인간 편도 유래 오가노이드와 면역세포 3차원 공배양 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 편도 유래 오가노이드와 면역세포 3차원 공배양 방법에 관한 것으로, 상세하게는 편도 오가노이드의 배양에 최적화된 배양 조건과 편도 면역 세포의 배양에 최적화된 배양 조건을 결합하여, 편도 오가노이드 및 면역 세포의 공동배양이 가능함을 밝히고, 이를 응용하여 편도 조직의 시험관 내 구현을 가능케 하였다. 본 발명은 편도 조직의 오가노이드 및 면역 세포의 장기간 공배양이 가능한 특이적 배양 조건의 조성 및 그를 활용한 배양 기법 및 해당 플랫폼을 활용한 면역 세포 활성화 측정 기법 등을 포함한다. 본 발명에 따른 편도 조직 오가노이드-면역세포 공배양 플랫폼은 항원 특이적 T 세포의 증식 및 시험관 내 항체 형성, 편도 및 면역질환 관련 치료제의 스크리닝 등에 폭넓게 적용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 2501/105 (2013.01)  
 C12N 2501/115 (2013.01)  
 C12N 2501/2301 (2013.01)  
 C12N 2501/415 (2013.01)  
 C12N 2501/998 (2013.01)  
 C12N 2533/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111386
과제번호	2018R1A2B3004269
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	타액선 성체줄기세포 오가노이드 기반 질환모델링을 통한 타액선 질환 맞춤형 치료
전략 수립	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
공지예외적용	: 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

IGF-1, IL-2 및 항-CD28 항체를 유효성분으로 포함하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양을 위한 배양액 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배양액 조성물은 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2; PGE2)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 배양액 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 배양액 조성물은 최종 농도 10 내지 200 ng/ml의 IGF-1, 최종 농도 1 내지 20 ng/ml의 IL-2, 최종 농도 1 내지 10  $\mu$ g/ml의 항-CD28 항체 및 최종 농도 0.1 내지 0.5  $\mu$ M의 PGE2를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양액 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 배양액 조성물은 표 1에 기재된 구성성분으로 이루어진 것을 특징으로 하는 배양액 조성물.

#### 청구항 5

- (1) 분리된 편도 조직으로부터 편도 줄기세포를 분리하는 단계;
- (2) 상기 분리된 편도 줄기세포를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계; 및
- (3) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 배양액 조성물에 상기 ECM에 접촉된 편도 줄기세포를 배양하여, 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 배양된 편도 오가노이드는 p75, CD44, CK19, CK14, MUC1, CK13 및 CK8이 발현되는 것을 특징으로 하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 편도 유래 오가노이드와 면역세포 3차원 공배양 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] "오가노이드(organoid)"란 조직에서나 혹은 배아줄기세포에서 유래된 세포를 이용하여 이를 3D 형태로 배양을 하여 마치 인공장기와 같은 형태로 만들 수 있는 것을 의미한다. 오가노이드는 장기의 'organ' 과 같은 의미를 가진 접미어로 '장기와 유사한 것'이라는 말을 지니고 있다. 오가노이드는 3차원 배양 방법을 통하여 세포와 세포의 기능이 좀 더 잘 배열되고, 기능성을 가지는 기관 같은 형태와 기능을 지닌다. 오가노이드는 줄기세포연구와 3D 세포배양 등이 개발되고, 다양한 조직으로 분화시킬 수 있는 생장 및 분화 인자의 최적화 연구와 함께 주목을 받고 있다.

[0003] 편도(tonsil)는 B 세포와 T 세포로 구성된 림프 소포(lymphoid follicle)의 일종으로 구강 내 면역 기능을 담당하고, 면역 세포 이외에 림프 소포(lymphoid follicle)를 둘러싸는 비-케라틴화 상피(non-keratinized epithelium)로 구성되어 있다. 기존의 오가노이드 배양 기술은 줄기세포(stem cells) 및 상피세포(epithelial

cells) 위주로 배양이 된다는 단점을 가지고 있고, 특히나 면역 세포 같은 기질세포(stromal cells)의 배양 조건 최적화 및 유지에는 성공하지 못하고 있다. 이에 편도 오가노이드 배양 및 면역세포 배양에 최적화된 배양 조건을 구축할 필요성이 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1953977호 (2019.02.25 등록)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 IGF-1, IL-2 및 항-CD28 항체를 유효성분으로 포함하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양을 위한 배양액 조성물을 제공하는데 있다. 또한, 추가적으로 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2; PGE2)를 더 포함하는 배양액 조성물을 제공하는데 있다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양 방법을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IGF-1, IL-2 및 항-CD28 항체를 유효성분으로 포함하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양을 위한 배양액 조성물을 제공한다. 또한, 추가적으로 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2; PGE2)를 더 포함하는 배양액 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 (1) 편도 조직으로부터 편도 줄기세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 편도 줄기세포를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계; 및 (3) 상기 배양액 조성물에 상기 ECM에 접촉된 편도 줄기세포를 배양하여, 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0009] 본 발명은 인간 편도 유래 오가노이드와 면역세포 3차원 공배양 방법에 관한 것으로, 상세하게는 편도 오가노이드의 배양에 최적화된 배양 조건과 편도 면역 세포의 배양에 최적화된 배양 조건을 결합하여, 편도 오가노이드 및 면역 세포의 공동배양이 가능함을 밝히고, 이를 응용하여 편도 조직의 시험관 내 구현을 가능케 하였다. 본 발명은 편도 조직의 오가노이드 및 면역 세포의 장기간 공배양이 가능한 특이적 배양 조건의 조성 및 그를 활용한 배양 기법 및 해당 플랫폼을 활용한 면역 세포 활성화 측정 기법 등을 포함한다. 본 발명에 따른 편도 조직 오가노이드-면역세포 공배양 플랫폼은 항원 특이적 T 세포의 증식 및 시험관 내 항체 형성, 편도 및 면역질환 관련 치료제의 스크리닝 등에 폭넓게 적용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 편도 오가노이드 2주 배양 후의 세포 분포 결과를 나타낸다.

도 2는 편도 오가노이드 배양에 따른 면역 세포 감소 현상을 나타낸다.

도 3은 면역 세포 감소 현상을 해결하기 위해 본 발명의 유효성분을 포함한 배양액 조성을 통한 오가노이드 배양 결과를 나타낸다.

도 4는 편도 오가노이드 배양에 따른 현미경 소견(a), 유세포 분석을 통한 면역세포 검출(b) 결과를 나타낸다. 도 4a는 passage 1에서 편도 오가노이드의 성장 및 면역 세포 클러스터 형성을 나타내며, 도 4b는 계대 배양에 따른 면역 세포 비율을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 오가노이드 내 마커 발현을 실제 편도조직과 비교한 결과를 나타낸다.

도 6은 오가노이드-면역세포 공배양 환경에서 PGE2의 농도에 따른 오가노이드 생성 정도를 광학 현미경 이미지

를 통해 분석한 결과이다.

도 7은 오가노이드-면역세포 공배양 환경에서 PGE2의 농도에 따른 면역세포 분포 정도를 유세포 분석법으로 분석한 결과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 IGF-1, IL-2 및 항-CD28 항체를 유효성분으로 포함하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양을 위한 배양액 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 배양액 조성물은 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2; PGE2)를 더 포함할 수 있다.
- [0012] 바람직하게는, 상기 배양액 조성물은 최종 농도 10 내지 200 ng/ml의 IGF-1, 최종 농도 1 내지 20 ng/ml의 IL-2, 최종 농도 1 내지 10  $\mu$ g/ml의 항-CD28 항체 및 최종 농도 0.1 내지 0.5  $\mu$ M의 PGE2를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 배양액 조성물은 표 1에 기재된 구성성분으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 또한, 본 발명은 (1) 편도 조직으로부터 편도 줄기세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 편도 줄기세포를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계; 및 (3) 상기에 따른 배양액 조성물에 상기 ECM에 접촉된 편도 줄기세포를 배양하여, 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포를 배양하는 단계를 포함하는 편도 줄기세포 유래 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포의 공배양 방법을 제공한다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 배양된 편도 오가노이드는 p75, CD44, CK19, CK14, MUC1, CK13 및 CK8이 발현될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 편도 오가노이드 및 편도 면역 세포를 배양하는 단계에서 PGE2가 첨가될 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 편도 줄기세포를 배양하는 방법은 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)와 접촉시켜 편도 줄기세포를 배양하는 것을 포함한다. 임의의 적합한 세포 외 매트릭스가 사용될 수 있다. 분리된 편도 줄기세포는 바람직하게는 상기 편도 줄기세포가 자연적으로 존재하는 세포 미세 환경을 부분적으로 모방하는 환경에서 배양된다. 이러한 세포 틈새는 줄기세포 운명을 제어하는 주요 조절 신호를 제공하는 세포 외 매트릭스와 같은 생체 물질의 존재하에서 상기 줄기세포를 배양함으로써 모방 될 수 있다. 세포 틈새는 줄기세포 및 주변 세포 및 상기 틈새의 세포에 의해 생성된 세포 외 매트릭스에 의해 부분적으로 결정된다. 본 발명의 바람직한 방법에서, 편도 줄기세포는 세포 외 매트릭스와 접촉하여 배양된다. "접촉"은 물리적 또는 기계적 또는 화학적 접촉을 의미하며, 이는 상기 생성된 편도 오가노이드 또는 편도 줄기세포 집단을 상기 세포 외 매트릭스로부터 분리하기 위해 힘이 사용될 필요가 있음을 의미한다. 바람직하게는, 편도 줄기세포는 ECM에 매립된다. 본 발명의 배양액은 세포 외 매트릭스로 확산 될 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, "오가노이드(organoid)"란 조직에서나 혹은 배아줄기세포에서 유래된 세포를 이용하여 이를 3D 형태로 배양을 하여 마치 인공장기와 같은 형태로 만들 수 있는 것을 의미한다. 오가노이드는 장기의 'organ' 과 같은 의미를 가진 접미어로 '장기와 유사한 것'이라는 말을 지니고 있다. 오가노이드는 3차원 배양 방법을 통하여 세포와 세포의 기능이 좀 더 잘 배열되고, 기능성을 가지는 기관 같은 형태와 기능을 지닌다. 오가노이드는 줄기세포연구와 3D 세포배양 등이 개발되고, 다양한 조직으로 분화시킬 수 있는 생장 및 분화 인자의 최적화 연구와 함께 주목을 받고 있다.
- [0019] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0020]
- [0021]
- [0022] <실험예>
- [0023] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0024] 1. 시약
- [0025] 본 발명에 다음의 시약들이 사용되었다.

[0026] 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin; BSA), 1×HBSS solution (# 14025092, Gibco), Collagenase, type II (# 4176, Worthington), Hyaluronidase (# H3506, Sigma), Y-27632 dihydrochloride (# 1254, Tocris), 48 well plate for suspension culture (# 677102, Greiner Bio-one), Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, Type 2 (BME 2) (# 3533-001-02, Trevigen), X-VIVO 15 media (# 04-418Q, Lonza), Primocin (# anti-pm, Invivogen), HEPES (# 15630-080, Gibco), GlutaMAX (# 35050-061, Gibco), B27 (# 12587, Gibco), NAC (N-acetyl-cysteine; # A9165, Sigma), Nicotinamide (# N0636, Sigma), A83-01 (# 2939, Tocris), Noggin (# 6057-NG, R&D), IGF-1 (# 100-11, Peprotech), FGF2 (# 100-18B, Peprotech), FGF10 (# 100-26, Peprotech), IL-2 (# 200-02, Peprotech), PGE2 (# P0409, Sigma), Purified anti-human CD3 antibody (#566685, BD), Purified anti-human CD28 antibody (#555725, BD), DMEM, High Glucose, w/ stable glutamine w/ sodium pyruvate (# L0103, Biowest), Fetal Bovine Serum (FBS), 1× Phosphate buffered saline (PBS), Zeocin (# R250-01, Life technologies), G-418 solution (# 4727878001, Roche), Rspol cells (3710-001-K, Cultrex), L-WNT3A cells (CRL-2647, ATCC), TrypLE express (# 12605-010, Life technologies), CellBanker 1 (Zenoaq)

[0027] **2. 인간 편도 줄기세포 유래 오가노이드 제작**

[0028] (1) 인간 편도 샘플을 채취한 후, 이를 보존액 (1% BSA가 첨가된 1× HBSS)에 넣어 당일 또는 다음날 실험 진행 전까지 4℃ 냉장고에 보관한다.

[0029] (2) 편도 샘플이 있는 보존액에 콜라게네이즈 타입 II(Collagenase type II) 0.5 mg/ml, 히알루로니데이즈 (Hyaluronidase) 0.5 mg/ml, Y-27632 10 mM을 첨가하여 용해 용액(digestion solution)을 각 샘플 당 20 ml 정도 만든 후, 37℃ 교반 배양기에 200 rpm으로 30 분간 보관한다.

[0030] (3) 반응시킨 편도 샘플을 70 μm 여과기(strainer)로 걸러서 용해되지 않은 조직을 제거한 후, 걸러진 용액을 300 g에 5 분간 원심분리하여 세포만을 얻는다.

[0031] (4) 세포수를 센 후, 48 웰 플레이트 기준  $1.0 \times 10^4$  cells이 들어가도록 세포수를 계산하여 다시 한 번 같은 조건으로 원심분리를 시행한다.

[0032] (5) 미리 1시간 이상 37℃에서 가열된 48 웰 플레이트를 꺼내서 한 웰 당 20 ul의 BME 2 매트릭스(matrix)를 세포 펠렛과 잘 섞은 후 각 웰에 분주하여 돔(dome) 형태를 만든다. 그 후 37℃에 20분간 보관한 후, 배지를 250 ul 각 웰에 넣어주어 배양한다.

[0033] (6) 이 때, 배양액 조성은 표 1과 같다.

[0034] (7) 배양 중에 2-3일 간격으로 기존의 배양액을 코니컬 튜브(conical tube)에 넣어준 후, 300 g에 5 분간 원심 분리를 시행한다. 그 후, 펠렛(pellet)에 포함된 세포 (주로 면역세포)를 새로운 배양액에 풀어서 웰에 넣어준다.

[0035] (8) 2주가 지나면 계대 배양(subculture)을 수행한다.

**표 1**

	최종 농도
X-VIVO 15 media	
Primocin	1 ×
HEPES	1 ×
Glutamax	1 ×
B27	1 ×
NAC	1 mM
Nicotinamide	10 mM
A83-01	0.5 uM
Wnt3a CM	5%
Rspol CM	5%
Noggin	100 ng/ml
IGF-1	50 ng/ml
FGF10	20 ng/ml
FGF2	10 ng/ml

Y-27632	5 $\mu$ M**
IL-2	10 ng/ml
anti-CD28 antibody	2 $\mu$ g/ml**

[0037] \*\* Y-27632, 항-CD28 항체는 배양 후 3-4일 동안만 넣어준다.

[0038] **3. 오가노이드 배양액을 위한 조건 배지(Conditioned media)의 제작**

[0039] (1) Cell stock ( $1.0 \times 10^6$  cells/vial)을 질소 탱크에서 꺼내어 수조에 반 정도 녹을 때까지 반응 후 녹인 세포주를 성장 배지 5ml를 넣어주어 T25 플라스크에 배양한다. (성장 배지 : DMEM with 10% FBS)

[0040] (2) 하루 지난 후, T25 플라스크에 다음과 같이 선별 시약을 추가한다.

[0041] i) L-WNT3A 세포를 위해, 최종 농도 0.4 mg/ml이 되도록, 8  $\mu$ l/ml G-418 용액 (50 mg/ml)을 첨가

[0042] ii) Rspo1 세포를 위해, 최종 농도 0.3 mg/ml이 되도록, 3  $\mu$ l/ml 제오신(Zeocin) (100 mg/ml)을 첨가

[0043] (3) 하루 지난 후 T25 플라스크가 꽉 차기 때문에 계대 배양을 시작한다.

[0044] (4) 배지를 흡입하고 미리 데워둔  $1 \times$  PBS로 세척을 1번 수행한다.

[0045] (5) 상등액을 제거하고 미리 데워둔 TrypLE을 2 ml 넣어준 후, 배양기에 3분 넣어준다.

[0046] (6) T25 플라스크를 꺼내어 성장 배지 2 ml를 넣어준 후, 세포를 수확하여 15 ml 튜브에 옮긴다.

[0047] (7) 300 g에서 3분 동안 원심분리한다.

[0048] (8) 상등액을 제거하고 성장 배지 2 ml를 넣어준 후, 펠렛을 잘 쪼개 다음 1 ml를 분주하여 T75 플라스크에 넣어 준 후, 나머지 배지 (최종 12ml)와 선별 시약을 조성대로 넣어 준다. 그 후에, 배양기에 보관한다.

[0049] **< WNT3A CM >**

[0050] (9-1) 2-3일 후에 한 번 더 계대 배양하여 총 10개의 T75 플라스크를 준비한다. 이때 분할비(split ratio)는 1:10 정도가 적당하다. 이때, 분할(split) 후, 선별 배지가 아닌 수확 배지를 10 ml 넣어준다. (수확 배지: 10 ml of DMEM with 10% FBS)

[0051] (9-2) L-WNT3A 세포가 자라면서 WNT3A를 분비한다. 4일 후에 첫 번째 배지를 수확하여 냉장 보관하고 (1<sup>st</sup> Batch) 수확 배지 10ml를 넣어준다.

[0052] (9-3) 3일 후 배지를 수확하여 (2<sup>nd</sup> Batch) 1<sup>st</sup> Batch 배지와 섞어준 후 3,000 rpm 에 10 분간 원심분리한다(4  $^{\circ}$ C).

[0053] (9-4) 상층액을 0.22  $\mu$ m 진공 필터 플라스크 위쪽에 부어 준 후, 진공을 걸어 여과한다.

[0054] **< Rspo1 CM >**

[0055] (10-1) 2-3일 후에 한 번 더 계대 배양하여 총 10개의 T75 플라스크를 준비한다. 이 때 분할비(split ratio)는 1:10 정도가 적당하다.

[0056] (10-2) 2-3일 후에 T75 플라스크가 70~80% 정도 찰 때, 다음 15ml의 수확 배지를 넣어준다. (수확 배지: 15 ml of AdDMEM/F12 with  $1 \times$  GlutaMAX)

[0057] (10-3) 1주일 간 배양기에서 배양한다.

[0058] (10-4) 1주일 후 상등액을 50 ml 튜브에 수확한 후, 3,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심분리한다.

[0059] (10-5) 상층액을 22  $\mu$ m 진공 필터 플라스크 위쪽에 부어 준 후, 진공을 걸어 여과한다.

[0060] (11) 수확된 조건 배지를 분주(aliquot)하여 50ml 튜브에 냉동 보관하고, 필요시에 1개씩 꺼내어 냉장 보관하여 사용하도록 한다.

[0061] **5. 인간 편도 줄기세포 유래 오가노이드의 계대**

[0062] (1) 배양액을 새 코니컬 튜브(conical tube)에 넣어준 후, 300 g에 5 분간 원심분리를 시행한다. 위의 상층액을



제거한 후, 48 웰 플레이트 1 웰 당 500  $\mu$ l의 TrypLE Express (10 mM의 Y-27632 첨가)를 넣어주어 피펫팅(pipetting) 한 후, 이미 튜브에 있는 세포 펠렛과 같이 37°C 수조에 10분간 반응시킨다.

(2) 1 ml의 PBS를 넣어 준 후 피펫팅(pipetting)을 세게 20회 이상 시행한 후, 300 g로 5분간 원심분리한다.

(3) 세포 펠렛을 40  $\mu$ m 여과기(strainer)로 걸러내어 분리되지 않은 오가노이드를 걸러내서 제거한다.

(4) 걸러진 세포 부유물은 세포수를 세어서 상기 오가노이드 제작 방법을 반복한다.

#### <실시예>

편도 샘플에서 세포를 추출하여 오가노이드 배양을 시도하였다. 이 때, 면역 세포의 성장을 촉진시키기 위해 다음과 같은 전략을 시도하였다; 1) 기존의 오가노이드 배양에 처리하는 기본 배지인 Advanced DMEM/F12 대신 면역 세포 배양에 최적화된 X-VIVO 15 배지를 기본으로 오가노이드 배양 배지를 만든다. 2) T 세포의 활성화를 위해 anti-CD3 antibody (1  $\mu$ g/ml)와 anti-CD28 antibody (2  $\mu$ g/ml)를 수용성 형태(soluble form)로 배지에 첨가하였다. 3) 추가적인 T 세포 성장을 위해 배지에 IL-2를 추가하였다. 위의 세 가지 전략으로 기존의 배지 대비 면역 세포의 성장을 촉진시킬 수 있는 조건을 2주간 (passage 0) 스크리닝 한 후, 최적의 조건들을 선별하여 계대배양(subculture) 후에도 면역 세포 및 오가노이드의 배양 및 성장이 유지되는 지를 확인하였다.

#### 1. X-VIVO 15 media와 T 세포 자극 항체의 사용법에 따른 면역 세포 성장

X-VIVO 15 배지를 기반으로 한 편도 오가노이드 배양액 (TS-media로 줄여 씀, 조성은 표 1를 참고)에서 배양한 오가노이드 및 면역 세포의 유지 정도를 2주 배양 후에 유세포분석(flow cytometry) 기법을 통하여 확인하였다. 이 때, 대조군으로는 X-VIVO 15 배지만을 사용한 조건을 추가하였고 각각 anti-CD3, anti-CD28 또는 anti-CD3 및 anti-CD28 자극을 통하여 T 세포의 활성화를 촉진하였다(표 2).

표 2

	( - )	Anti-CD3	Anti-CD28	Anti-CD3/28
X-VIVO 15	# 1	# 2	# 3	# 4
TS-media	# 5	# 6	# 7	# 8

각 조건에 따른 실험 결과는 도 1에 나타냈다.

X-VIVO 15 배양액만으로는 상피 세포 오가노이드의 제작에는 실패하였다. 다만, CD3/CD28 자극에 따른 T 세포의 증가가 X-VIVO 15 배양액에서 관찰되었다 (도 1, #4). 상피 세포 오가노이드 배양에 적합한 TS-media 에서는 오가노이드에서 유래한 세포인 상피 세포가 증가되어 있고, 면역 세포도 일정 부분 유지되고 있어서 상피세포 오가노이드의 면역세포의 공배양이 가능한 상황이라 판단하였다. 하지만 한 번의 계대를 수행한 후, 한 달 정도 배양을 유지하였을 때, 오가노이드의 성장이 우점하여 결과적으로 면역 세포의 비율이 실험에 적합하지 않을 정도로 줄어드는 현상을 확인하였다(도 2).

계대 후에도 면역 세포를 유지하고, 오가노이드와의 상호작용을 연구하기 좋은 모델 시스템 구축을 위해 해당 조건에 T 세포의 성장을 촉진하는 IL-2를 추가하는 배양액 조건에서 위 실험을 시행하였다. Passage가 지난 후에도 면역 세포의 성장을 유지하기 위해 T 세포의 성장을 촉진하는 IL-2를 추가하는 배양액 조건을 기반으로 실험을 수행하였다. 그 결과, IL-2와 항-CD28 항체가 들어간 조건에서 비교적 크기가 큰 오가노이드의 형성을 passage 0에서 확인하였다. 이 때, 항-CD3 항체가 추가되었을 때 오히려 오가노이드의 성장이 억제되는 것을 확인하였는데(도 3a), 이는 과도한 면역 반응에 의해 오가노이드를 이루는 상피세포가 면역 세포의 공격을 받아서 일어난 것으로 생각된다(도 3b).

따라서 passage 1에서 항-CD28 항체 + IL-2의 조건으로 면역 세포가 유지되는 지를 확인하였고, 그 결과 해당 조합의 조성물로 편도 오가노이드가 유지되고 (검은색 화살표), 근처에 면역 세포 성장으로 인한 클러스터가 형성되는 것을 (빨간색 화살표) 확인할 수 있었다(도 4a).

실제로 해당 세포를 활용하여 유세포 분석법으로 세포를 분석할 때, passage 0와 비교하였을 때, 비슷한 정도의 면역 세포 비율이 유지되어 있는 것을 확인하였고, T 세포 활성화에 따른 T 세포 population의 증가 및 B 세포도 어느 정도 유지되고 있음을 passage 1(한 달 배양 후)에서도 확인할 수 있었다(도 4b).

#### 2. 편도 오가노이드 내 마커 발현 확인



[0077] 편도 오가노이드가 정상적으로 생성되었으며, 원 조직에서 발현하는 마커가 오가노이드에서도 유지되는 지를 확인하기 위해 오가노이드 배양 후 IF 염색 기법을 통하여 오가노이드의 마커 발현 유무를 확인하였다(도 5).

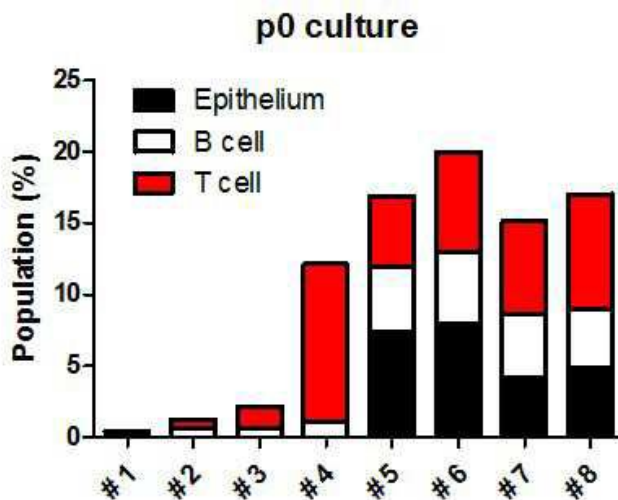
[0078] 그 결과, 기존의 조직에서 발현하는 마커들이 모두 오가노이드에서도 발현함을 확인하였다. 다만, 조직에서 기저 (basal) 부분에 발현하는 마커들은 (p75, CD44, CK19, CK14) 오가노이드의 바깥에서 발현하고, 표면 (surface) 부분에 발현하는 마커들은 (MUC1, CK13, CK8) 오가노이드의 안쪽에서 발현하는 것이 관찰되어 조직과는 반대되는 방향(orientation)을 가지는 것으로 파악되었는데, 이는 장 오가노이드(intestinal organoid) 등 다른 오가노이드에서도 관찰되는 공통적인 현상이다.

[0079] **3. 배양액 내 PGE2 첨가에 따른 오가노이드 생성 정도 확인**

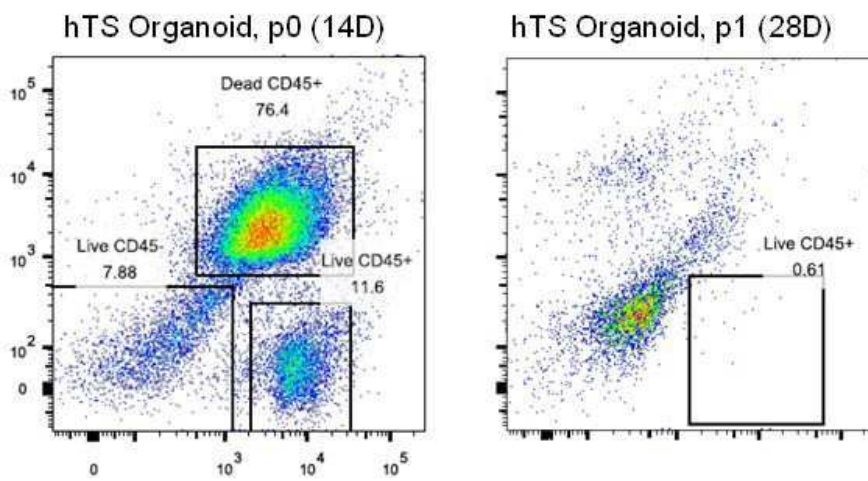
[0080] 추가적으로, PGE2 의 배양액 내 농도에 따른 오가노이드 생성 정도의 변화를 광학 현미경 이미지 분석을 통하여 확인해 보았다. PGE2가 없는 배양액 내에서는 오가노이드의 개수가 현저히 줄어드는 반면에 PGE2의 농도 의존적으로 농도가 높을수록 오가노이드의 개수 및 오가노이드의 크기가 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(도 6). 이 결과는 유세포 분석을 통한 단일세포 분석으로도 증명되었으며(도 7, 왼쪽), PGE2의 농도가 5  $\mu$ M일 때 오가노이드를 구성하는 상피세포의 비율이 PGE2를 처리하지 않은 군 대비 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다. 반면에 면역 세포의 비율은 유의미하게 감소하는 것을 확인하였고(도 7, 오른쪽), 이를 통하여 PGE2는 공배양 조건에서 면역 세포와 오가노이드를 구성하는 상피 세포의 비율을 조절하는 중요한 인자임을 증명하였다. 실험 결과 해당 조건에서 면역 세포와 상피 세포간의 최적의 비율을 유지하기 위해서는 PGE2의 농도를 0.1 ~ 0.5  $\mu$ M로 하는 것이 적절하다는 결론에 도달하였다.

**도면**

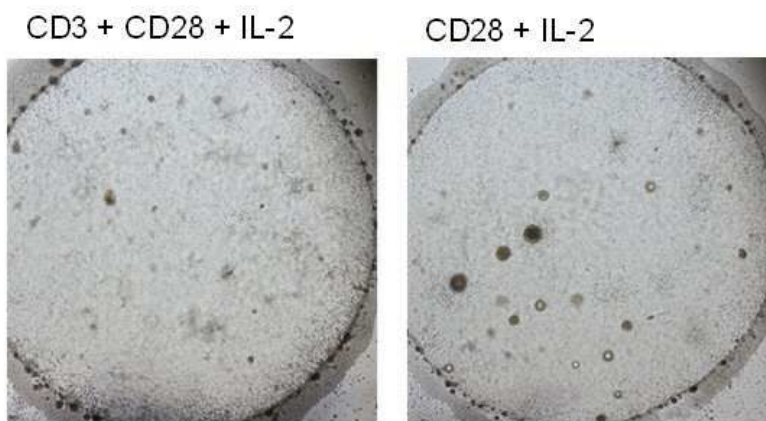
**도면1**



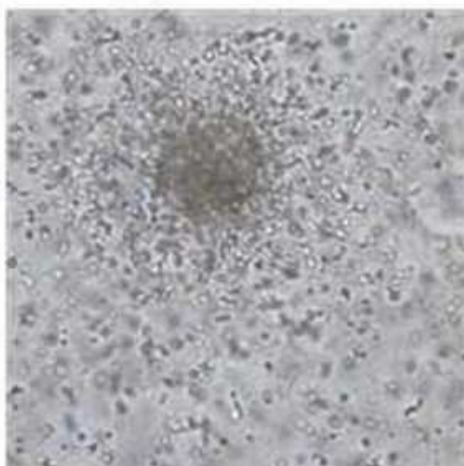
도면2



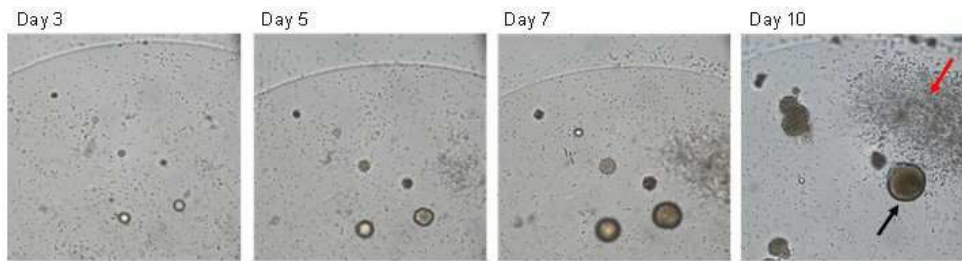
도면3a



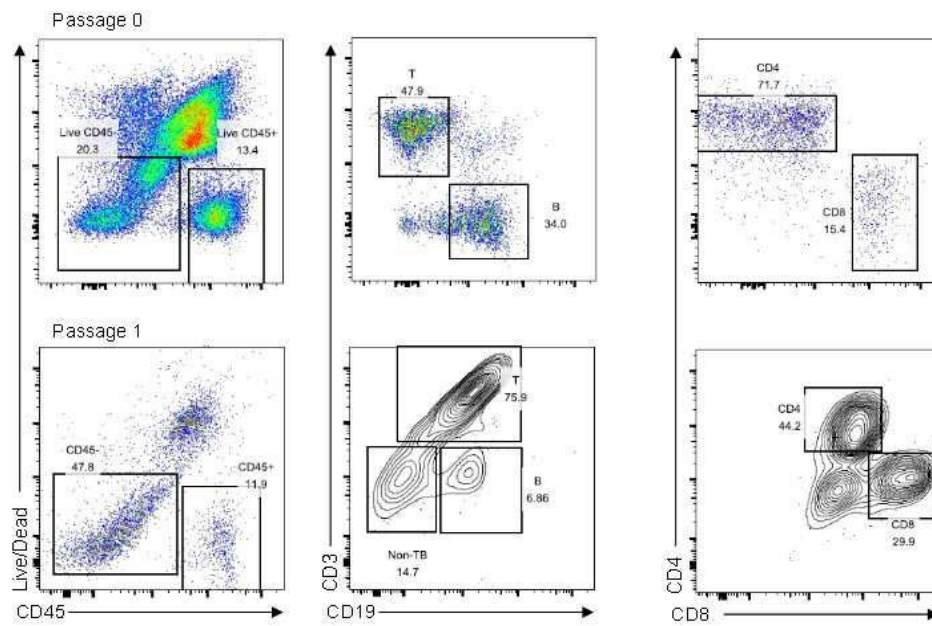
도면3b



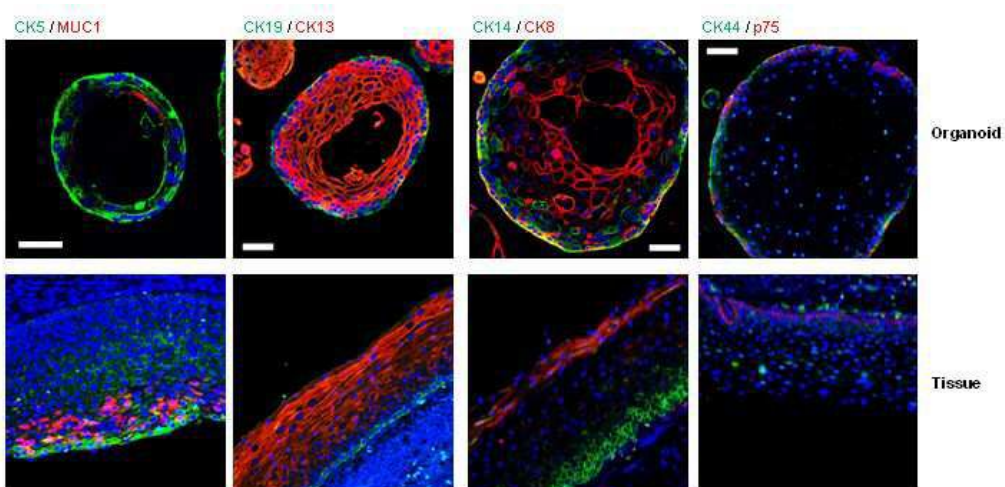
도면4a



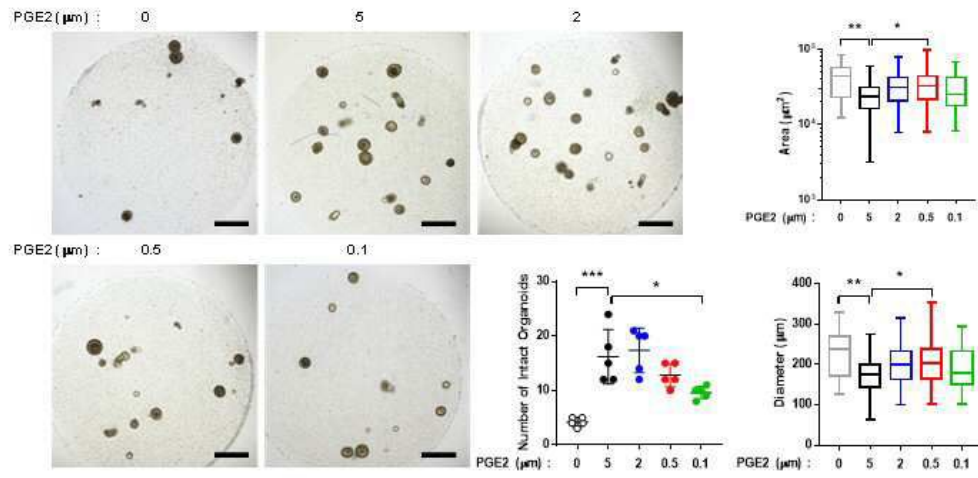
도면4b



도면5



도면6



도면7

