



등록특허 10-2582460



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월26일

(11) 등록번호 10-2582460

(24) 등록일자 2023년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12M 3/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0688 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0019949

(22) 출원일자 2021년02월15일

심사청구일자 2021년02월15일

(65) 공개번호 10-2021-0103982

(43) 공개일자 2021년08월24일

(30) 우선권주장
1020200018364 2020년02월14일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
US20180256642 A1*
INTEGRATIVE BIOLOGY, vol.7(12),
pp.1598~1610(2015)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 세라트젠

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학
원 332에이비씨호(신촌동)

(72) 발명자

조승우

서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호

민성진

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인엠에이피에스

전체 청구항 수 : 총 5 항

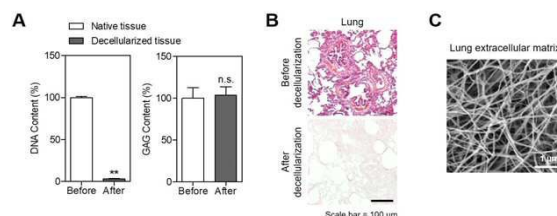
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 폐 오가노이드 배양 및 이식을 위한 탈세포 폐 조직 유래 지지체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 탈세포 폐 조직(Lung Extracellular Matrix; LuEM)을 이용한 폐 오가노이드 배양 및 이식용 지지체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0697 (2013.01)

C12N 2502/27 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

(72) 발명자

최이선

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호

김유혼

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호

배수한

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 ABMRC 224호

이진구

서울특별시 성동구 독서당로62길 43, 1-1002

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711083321

과제번호 2017R1A2B3005994

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 삼차원 세포 패터닝 미세자극 기반 심장 및 골격 근육세포 리프로그래밍 효율 증진

연구(3/3)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711105054

과제번호 2018M3A9H1021382

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발(R&D)

연구과제명 [통합이지마로][2세부]간 조직 특이적 매트릭스와 마이크로 디바이스를 이용한 간

오가노이드 생산 플랫폼 개발(1/2단계, 3/3차년도)

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

- (a) 분리된 폐 조직을 0.1 내지 5%의 Triton X-100 및 0.01 내지 0.5% 수산화 암모늄을 포함하는 탈세포화 용액과 함께 교반시켜 탈세포된 폐 조직을 제조하는 단계;
- (b) 상기 탈세포된 폐 조직을 건조하여 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질(Lung Extracellular Matrix, LuEM)을 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 건조된 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계; 를 포함하는 지지체 조성물 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 분리된 폐 조직은 탈세포 전에 세절하는 단계를 더 포함하는 지지체 조성물의 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 (a) 단계의 탈세포는 폐 조직 세포가 95 내지 99.9% 제거된 지지체 조성물 제조방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 (b) 단계 이후, 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질은 0.01 내지 10 mg/mL 로 포함되도록 조절하는 단계를 더 포함하는 것인 지지체 조성물 제조방법.

청구항 10

제4항의 제조방법에 의해 제조된 지지체 조성물에서 폐 오가노이드를 배양하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폐 오가노이드 배양 및 이식을 위한 탈세포 폐 조직 유래 지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 오가노이드는 3차원 세포 구조체로서, 조직을 구성하고 있는 다양한 세포로 구성되어 있어 생체내의 환경을 모사할 수 있다는 점에서 최근에 주목받고 있다. 따라서 기초 생물학 연구 분야에서부터 신약 개발, 질병 모델링, 재생 치료 등 다양한 응용 연구 분야에 이르기까지 여러 부분에서 활발히 연구 및 활용되고 있다.

[0004] 현재 질병 모델의 경우 동물 모델이 많이 이용되고 있는데, 동물은 생리적인 측면에서 인간과 상이하기 때문에 실제 사람의 질병을 동물에서 구현하기에는 한계가 있고 윤리적인 문제도 꾸준히 대두되는 실정이다. 환자 유래의 세포로 제작된 오가노이드 모델을 이용하면 질병에 대한 기전 연구와 환자 맞춤형 진단까지 가능하다는 점에서 각광받고 있다.

[0005] 현재 생체 내 여러 장기의 줄기세포에서 유래하는 다양한 종류의 오가노이드 모델이 구축되어 있다. 이러한 다양한 종류의 오가노이드를 배양하고자 전세계적으로 많은 연구자들이 매트릭셀을 배양 지지체로서 이용하고 있다. 하지만 매트릭셀은 쥐 육종암으로부터 유래한 성분으로 감염 및 면역 거부 반응의 위험성으로 인해 매트릭셀에서 배양된 오가노이드를 사람에게 이식하는 시도에 우려가 제기되고 있다. 또한, 조직 특이적 세포외기질 성분이 아니기 때문에 오가노이드 분화를 위해 최적화된 미세환경을 제공할 수 없다. 따라서 매트릭셀을 대체할 수 있는 생체적합하고 조직 특이적인 배양 지지체 개발이 필요하다.

[0006] 유전적 요인, 과도한 흡연, 그리고 대기오염으로 발생하는 미세먼지, 바이러스 및 세균 등으로 인해 발병하는 폐 질환은 전 세계적으로 주요한 사망 원인 중 하나이다. 하지만 질병 모델의 부재로 인해 폐 질환 기전 연구가 쉽지 않고 치료법의 개발 또한 매우 어렵다. 따라서 인간의 폐 질환을 정밀하게 모사할 수 있는 폐 질환 체외모델의 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

[0007] 본 발명은 폐 조직을 탈세포화하여 얻은 폐 조직 특이적 세포외기질 성분을 하이드로젤 지지체로 활용하여 이를 폐 오가노이드 배양에 이용하는 새로운 플랫폼을 제시하고 있다. 이렇게 폐 조직을 탈세포화하여 얻은 지지체는 폐 조직에 존재하는 다양한 세포외기질 성분과 성장인자들을 포함하고 있어, 폐 오가노이드의 발달, 성장 및 분화를 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다. 탈세포 지지체를 이용하여 제작된 폐 오가노이드는 다양한 폐 질환 모델로 적용될 수 있는 가능성이 높다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0143465호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 폐지 폐 조직을 화학적 처리하여 대량의 탈세포 조직을 얻고 이를 기반으로 하이드로젤 지지체를 제작하여 폐 오가노이드 배양에 적용하기 위한 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0014] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.
- [0015] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0016] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 일 양상은 폐 조직 유래 세포외기질 (Lung Extracellular Matrix, LuEM)을 포함한 지지체 조성물을 제공한다.
- [0020] 상기 “세포외기질(extracellular matrix)”은 포유류 및 다세포 생물(multicellular organisms)에서 발견된 조직의 탈세포화를 통해 제조된 세포 성장용 자연 지지체를 의미한다. 상기 세포외기질은 투석 또는 가교화를 통해 더 처리할 수 있다.
- [0021] 상기 세포외기질은 콜라겐(collagens), 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸(proteoglycans), 항균제(antimicrobials), 화학유인물질(chemoattractants), 시토카인(cytokines), 및 성장 인자에 제한되지 않는, 구조형 및 비구조형 생체 분자(biomolecules)의 혼합물일 수 있다.
- [0022] 상기 세포외기질은 포유 동물에 있어서 다양한 형태로서 약 90%의 콜라겐을 포함할 수 있다. 다양한 생체 조직에서 유래한 세포외기질은 각각의 조직에 필요한 고유 역할 때문에 전체 구조체 및 조성이 상이할 수 있다.
- [0023] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.
- [0024] 또한, 본 발명의 일 구체예로, 상기 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질은 0.01 내지 10 mg/mL, 구체적으로 0.5 내지 9 mg/mL 더욱 구체적으로 1 mg/mL 내지 8 mg/mL, 가장 구체적으로는 1, 3, 5 또는 7 mg/mL, 최적화된 구체예로는 7 mg/mL로 포함하는 것일 수 있다. 상기 범위 외의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없거나, 제조 또는 활용에 있어서 부적합할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예로, 상기 조성물은 0.1 내지 10Hz 기준 탄성계수가 1 내지 100 Pa일 수 있고, 상기 조성물이 상기 범위의 탄성계수를 가짐으로써 안정적인 고분자 네트워크를 형성할 수 있다.
- [0026] 상기 지지체 조성물은 탈세포화하여 수득한 폐 조직 매트릭스 조성물을 기반으로 제조한 3차원 하이드로젤을 포함하며, 폐 오가노이드 배양에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0027] 상기 탈세포화된 폐 조직은 실제 조직 특이적 세포외기질 성분을 포함하므로 해당 조직의 물리적, 기계적, 생화학적 환경을 제공할 수 있으며, 폐 조직 세포로의 분화 및 조직 특이적 기능성을 증진시키는데 매우 효율적이다.
- [0028] 상기 “오가노이드(organoid)”는 조직 또는 전분화능줄기세포에서 유래된 세포를 3D 형태로 배양하여 인공장기와 같은 형태로 제작한 초소형 생체기관을 의미한다.
- [0029] 상기 오가노이드는 줄기세포에서 발생하고 생체 내 상태와 유사한 방식으로 자가-조직화(또는 자가-패턴화)하는 장기 특이적 세포를 포함한 삼차원 조직 유사체로서 제한된 요소(Ex. growth factor) 패턴닝에 의해 특정 조직으로 발달할 수 있다.
- [0030] 상기 오가노이드는 세포의 본래 생리학적 특성을 가지며, 세포 혼합물(한정된 세포 유형뿐만 아니라 잔존 줄기세포, 근접 생리학적 니치(physiological niche)를 모두 포함) 원래의 상태를 모방하는 해부학적 구조를 가질

수 있다. 상기 오가노이드는 3차원 배양 방법을 통해 세포와 세포의 기능이 더욱 잘 배열되고, 기능성을 가지는 기관 같은 형태와 조직 특이적 기능을 가질 수 있다.

[0032] 본 발명의 다른 일 양상은 (a) 분리된 폐 조직을 탈세포화하여 탈세포된 폐 조직을 제조하는 단계; (b) 상기 탈세포된 폐 조직을 건조하여 탈세포 폐 조직 세포외기질(Lung Extracellular Matrix, LuEM)을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 건조된 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계; 를 포함하는 지지체 조성물 제조 방법을 제공한다.

[0033] 상기 (a) 단계는 분리된 폐 조직을 탈세포화하여 탈세포된 폐 조직을 제조하는 단계이다.

[0034] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 (a) 단계에서 분리된 폐 조직은 탈세포 전에 세절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명은 탈세포 전에 폐 조직을 세절하는 단계를 포함하여, 탈세포 공정이 더 효율적이고 완전한 세포 제거가 가능하다. 상기 분리된 폐 조직의 세절 방법은 공지의 방법 (기구)과 크기로 이루어질 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 (a) 단계에서 상기 폐 조직을 탈세포화 용액에서 교반시키는 것일 수 있다.

[0036] 상기 탈세포화 용액은 폐 조직에서 세포를 제거하기 위한 다양한 성분을 포함할 수 있고, 예컨대, 고장성 식염수(hypertonic saline), 과산화 아세트산(peracetic acid), 트리톤 X-100 (Triton X-100), SDS 또는 기타 세제 성분을 포함할 수 있으나, 본 발명의 일 구체예에서 상기 탈세포화 용액은 0.1 내지 5%의 Triton X-100 및 0.01 내지 0.5% 수산화 암모늄, 더욱 구체적으로는 1% Triton X-100 및 0.1% 수산화 암모늄(ammonium hydroxide)을 포함하는 것일 수 있다. 상기와 같은 탈세포화 용액을 사용함으로써, 기존의 공정에 비하여 완화된 조건에서 탈세포를 진행함으로써 제조된 지지체 내 DNA를 효과적으로 제거함과 동시에 폐 조직 내의 다양한 단백질들이 더 많이 보존될 수 있다.

[0037] 상기 교반은 24 내지 72시간, 더욱 구체적으로는 36 내지 60시간, 가장 구체적으로는 40 내지 56시간, 일 예시로 48시간 동안 이루어지는 것일 수 있고, 이러한 교반 (탈세포) 과정을 통해 폐 조직 세포가 95 내지 99.9%, 더욱 구체적으로는 96 내지 98%, 가장 구체적으로는 96.75%가 제거된 것일 수 있다. 상기 범위 외의 시간 또는 폐 조직 세포 제거 수준으로 탈세포가 이루어질 경우 제조된 지지체 조성물의 품질이 저하되거나 공정 경제성이 떨어지는 문제점이 있다.

[0038] 상기 (b) 단계는 상기 탈세포된 폐 조직을 건조하여 폐 조직 세포외기질(Lung Extracellular Matrix, LuEM)을 제조하는 단계이다.

[0039] 상기 탈세포된 폐 조직을 건조하는 방법은 공지의 방법으로 수행될 수 있으며, 자연건조 또는 동결 건조될 수 있고, 멸균을 위해 건조 후 전자 빔 또는 감마 방사선에 의해 에틸렌 옥사이드 가스 또는 초임계 이산화탄소에 노출시킬 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 (b) 단계 이후, 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질은 0.01 내지 10 mg/mL, 구체적으로 0.5 내지 9 mg/mL 더욱 구체적으로 1 mg/mL 내지 8 mg/mL, 가장 구체적으로는 1, 3, 5 또는 7 mg/mL, 최적화된 구체예로는 7 mg/mL로 포함하는 것일 수 있다. 상기 범위 외의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없거나, 제조 또는 활용에 있어서 부적합할 수 있다.

[0041] 상기 건조된 세포외기질은 박리(tearing), 제분(milling), 절단, 분쇄 및 전단 단계를 포함하는 방법에 의해 세분될 수 있다. 상기 세분된 세포외기질은 냉동 상태 또는 냉동 건조 상태에서, 분쇄 또는 제분과 같은 방법에 의해 분말 형상으로 가공될 수 있다.

[0042] 상기 (c) 단계는 상기 건조된 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계이다.

[0043] 상기 겔화를 통해 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질을 가교시켜 3차원 하이드로젤 형태의 지지체를 제작할 수 있고, 겔화된 지지체는 실험, 스크리닝 뿐만 아니라 오가노이드 배양과 관련된 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0044] 상기 “하이드로젤”은 졸-겔 상변이를 통해 물을 분산매로 하는 액체가 굳어 유동성을 상실하고 다공성 구조를 이루는 물질로서, 3차원 망목 구조와 미결정 구조를 갖는 친수성 고분자가 물을 함유하여 팽창함으로써 형성될 수 있다.

[0045] 상기 겔화는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질을 산성 용액에서 펩신 또는 트립신과 같은 단백질 분해 효소로 용액화하고, 10X PBS와 1 M NaOH를 이용하여 중성 pH와 1X PBS 버퍼의 전해질 상태로 맞추고 37℃의 온도에서 30 분 동안 이루어지는 것일 수 있다.

- [0047] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 지지체 조성물 또는 상기 제조방법에 의해 제조된 지지체 조성물에서 폐 오가노이드를 배양하는 방법을 제공한다.
- [0048] 기존의 매트리지엘 기반 배양 시스템은 동물 암조직 유래의 추출물로서 배지 간의 차이가 크고 실제 폐의 환경을 모사해주지 못하고, 폐 오가노이드로 분화, 발달되는 효율이 미흡한 반면, 상기 지지체 조성물은 폐 조직 유사 환경을 조성할 수 있으므로 폐 오가노이드 배양에 있어서 적합하다.
- [0049] 상기 배양은 적합한 조건에서 세포를 유지 및 성장시키는 과정을 의미하며, 적합한 조건은 예컨대, 세포가 유지되는 온도, 영양소 가용성, 대기 CO2 함량 및 세포 밀도를 의미할 수 있다.
- [0050] 서로 다른 유형의 세포를 유지, 증식, 확대 및 분화시키기 위한 적절한 배양 조건은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 문서화 되어있다. 상기 오가노이드 형성에 적합한 조건은 세포 분화 및 다세포 구조의 형성을 용이하게 하거나 허용하는 조건일 수 있다.

발명의 효과

- [0052] 본 발명에서 개발된 탈세포 폐 조직 유래 인공 지지체는 기존의 대표적인 오가노이드 배양용 지지체인 매트리지엘이 가지고 있는 한계를 극복한 새로운 폐 오가노이드 배양 지지체로서 개발되어, 폐 오가노이드 기반 대규모 실험 스크리닝 플랫폼이나 조직 재생을 위한 세포 치료제 등 다양한 전임상, 임상 연구의 요소 기술로 활용되어 산업적, 경제적 측면에서 고부가가치를 창출하고 의료 신산업의 발전을 도모할 수 있을 것으로 기대된다.
- [0053] 본 발명에서 확립된 폐 오가노이드는 폐 조직을 구조적, 기능적으로 매우 정밀하게 모사할 수 있기 때문에, 현재 구현하기 어려운 다양한 폐 질환 모델 제작을 위해 활용될 수 있다. 현재 산업화, 도시화 과정에서 유발된 대기오염으로 인한 미세먼지가 심각한 사회 문제로 대두되고 있으나, 인체에 대한 유해한 영향에 대하여 아직 명확히 밝혀지지 않았고 이를 연구하기 위한 마땅한 모델도 없는 실정이다. 이외에도 낭포성섬유증, 특발성폐섬유증, 만성폐쇄성폐질환 등 다양한 난치성 폐 질환 모델 제작이 필요하다. 본 발명을 통해 확립된 성숙한 폐 오가노이드 배양 기술은 이러한 폐 질환 모델 제작을 더욱 용이하게 하고 폐 질환 기전 연구에 활용되어 의학 연구에 크게 기여할 것을 예상된다.
- [0054] 본 발명에서 개발된 탈세포 지지체는 조직 줄기세포 유래 폐 오가노이드 뿐 아니라 폐암 유래 오가노이드 배양에도 적용이 가능하므로 따라서 난치성 질환 및 암 환자 맞춤형 질환 모델 구축에 기여하여 정밀의학 플랫폼 기술로서도 활용될 수 있으며 최근 급증하는 정밀의학 시장의 규모를 고려하면 막대한 부가가치 창출이 가능할 것으로 기대된다.
- [0055] 폐 오가노이드의 배양을 위해서는 배양용 지지체로 매트리지엘이 필수적으로 요구된다. 여러가지 문제점을 가지고 있는 매트리지엘과 비교하여 본 발명에서 개발된 탈세포 지지체는 배양 시스템으로서 매트리지엘 이상의 기능성을 보여주며 보다 안전하고 비용적인 측면에서도 매우 유리한 장점을 가지고 있음이 검증된다. 따라서 이러한 매트리지엘 대체 효과만으로도 막대한 경제적 수익 창출이 예측된다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 폐 오가노이드 배양을 위한 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)를 제작 및 분석한 것이다.
- 도 2는 폐 오가노이드 배양을 위한 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 물성을 분석한 것이다.
- 도 3은 폐 오가노이드 배양을 위한 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 단백체를 분석한 것이다.
- 도 4는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 matrisome 단백질 종류와 정량 분석한 결과이다.
- 도 5는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 non-matrisome 단백질을 분석한 결과이다.
- 도 6 및 7은 탈세포 방법에 따른 탈세포된 폐 조직을 비교 분석한 결과이다.
- 도 8은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 농도별 생쥐 폐 오가노이드

드 형성을 분석한 것이다.

도 9는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 농도별 생쥐 폐 오가노이드 분화도를 분석한 것이다.

도 10은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)와 매트릭셀에서 배양한 생쥐 폐 오가노이드의 특이적 마커 단백질 발현을 비교 분석한 것이다.

도 11은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)와 매트릭셀에서 배양한 생쥐 폐 오가노이드의 기능성 분석한 결과이다.

도 12 및 13은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 장기 배양한 생쥐 폐 오가노이드를 분석한 것이다.

도 14는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 조직 특이적 효과를 확인한 결과이다.

도 15는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)를 이용한 인간 폐 오가노이드 배양을 나타낸 결과이다.

도 16는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 생쥐 폐 오가노이드를 이용한 폐 섬유증 모델 제작 가능성을 나타낸 것이다.

도 17은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 인간 폐 오가노이드를 이용한 인간 폐 섬유증 모델 제작을 나타낸 것이다.

도 18은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 제작된 인간 폐 섬유증 모델의 기능성을 분석한 결과이다.

도 19는 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 생쥐 폐 오가노이드를 이용한 미세먼지 질환 모델 제작을 나타낸 것이다.

도 20은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 장기 보관 가능성을 검증한 결과이다.

도 21은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 성분(Lung Extracellular Matrix, LuEM)을 이용하여 지지체 없는 배양 조건에서 폐 오가노이드의 형성 가능성을 확인한 것이다.

도 22는 배양 지지체 없이 형성된 생쥐 폐 오가노이드의 유전자 및 단백질 발현을 분석한 결과이다.

도 23은 배양 지지체 없이 형성된 인간 폐 오가노이드의 단백질 발현을 분석한 결과이다.

도 24는 배양 지지체 없이 형성된 인간 폐 오가노이드의 단백질 발현을 분석한 결과이다.

도 25는 배양 지지체 없이 형성된 생쥐 폐 오가노이드의 미세먼지 처리 실험을 나타낸 것이다.

도 26은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 생쥐 폐 오가노이드의 폐포 분화 촉진 결과를 나타낸 것이다.

도 27은 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 인간 폐 오가노이드의 단일 세포층(monolayer) 형성 및 이를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058]

본 발명에서는 돼지 폐 조직을 화학적 처리하여 대량의 탈세포 조직을 얻고 이를 기반으로 하이드로젤 지지체를 제작하여 폐 오가노이드 배양에 적용하였다. 새롭게 개발된 탈세포 배양 지지체는 간단한 공정과 적은 비용으로 제작이 가능하여 경제성이 높아 상용화에 유리하다. 또한, 개발된 탈세포 지지체는 면역원성을 지니는 세포들이 모두 제거된 상태이고, 폐 조직 특이적 고유한 세포외기질 성분 및 각종 인자들을 포함하기 때문에 폐 오가노이드 배양을 개선시킬 수 있다.

[0059]

폐 오가노이드를 배양하기 위한 최적의 조건을 찾기 위해 다양한 농도의 탈세포 폐 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 오가노이드 배양 실험을 진행하였다. 최적화된 탈세포 폐 조직 지지체에서 배양된 폐 오가노이드는 분화가 증진된 것을 확인하였다. 상용화된 지지체인 매트릭셀과 비교하였을 때, 다양한 폐 조직세포 특이적 단백질

발현이 유사하게 관찰되었다. 또한, 여러 계대에 걸쳐 장기 배양이 가능한 것을 확인하였다. 이를 통해 제작된 탈세포 지지체가 폐 오가노이드 배양 매트릭스로서 매트릭스의 대체제로 이용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0060] 본 발명에서 탈세포 폐 조직 지지체를 활용하여 생쥐 유래 폐 오가노이드 뿐만 아니라 인간 유래 폐 오가노이드 배양도 가능함을 확인하였다. 탈세포 지지체에서 배양한 인간 폐 오가노이드도 폐 조직세포 특이적 단백질을 잘 발현하고 장기배양이 가능한 것을 확인하였다.

[0061] 본 발명에서는 탈세포 지지체 내에서 폐 오가노이드를 삼차원 배양하는 방법뿐만 아니라 배양액에 용액화된 탈세포 지지체를 추가하여 배양 지지체 없이도 폐 오가노이드를 배양하는 방법을 추가적으로 구축하였다. 배양액에 탈세포 지지체 용액을 추가했을 때 오가노이드 형성 효율이 크게 증가하였으며, 폐포 특이적 세포로 분화가 증진된 것을 확인하였다. 하이드로젤 지지체 없이 오가노이드를 배양할 수 있으면 기존 지지체 내에서 오가노이드를 배양하는 방식과는 달리 오가노이드에 직접 원하는 인자나 자극을 가할 수 있으며 샘플 분리, 수거가 용이하여 오가노이드 연구에 있어 많은 장점을 가질 수 있다.

[0062] 나아가 본 발명에서는 폐 오가노이드를 이용한 질환 모델 제작 가능성을 확인하였다. 미세먼지 입자를 농도별로 첨가하여 미세먼지 유해성 연구를 위한 폐 오가노이드 모델을 제작하였고, 폐섬유화를 유도하는 약물을 처리하여 폐 섬유증 질환을 모델링 할 수 있음을 보여주었다. 이러한 질환 모델 플랫폼은 폐 섬유증 관련 연구 및 약물 스크리닝에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0063] 본 발명에서는 폐포 특이적 오가노이드를 배양하는 기술도 추가적으로 구축하였다. 폐포는 폐에서 기체 교환의 역할을 수행하는 단위체로 가장 중요한 폐의 구성 조직 중 하나이다. 폐포 오가노이드를 이용하면 보다 다양한 폐 질환 연구가 가능할 것으로 기대된다.

[0065] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0067] **실시예 1: 폐 오가노이드 배양을 위한 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 제작 및 분석**

[0068] **실시예 1-1. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 제조**

[0069] 폐 조직을 작게 잘라준 뒤, 탈세포화 용액인 1% Triton X-100 및 0.1% 수산화 암모늄(ammonium hydroxide)을 냉장 조건에서 48시간 처리하였다. 이 후, 동결건조 처리를 통해 분말 형태의 탈세포 폐 조직 세포외기질을 제조하였다.

[0070] **실시예 1-2. 지지체 조성물의 제조**

[0071] 건조된 분말 형태의 조직은 장기간 보관 가능하며, 4 mg/mL 펩신 용액 (돼지 위 점막 유래 펩신 파우더 4 mg를 0.02 M HCl 1 mL에 녹인 용액)에 48시간 동안 용해시킨 후, 10X PBS와 1 M NaOH를 이용하여 중성 pH와 1X PBS 버퍼의 전해질 상태로 균일하게 섞은 후 37℃의 온도에서 30분 동안 겔화(gelation)시켜 하이드로젤 형태의 지지체 조성물을 제조하였다.

[0074] **실험예 1: 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 분석**

[0075] **실험예 1-1. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 특성 분석**

[0076] 돼지 폐조직으로부터 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)를 제작하고 이의 특성을 분석하였다.

[0077] 구체적으로, 제작된 탈세포 지지체에서 세포가 충분히 제거 되었는지 세포외기질 (extracellular matrix) 성분들이 충분히 남아 있는지 확인하기 위해 각각 DNA와 GAG (Glycosaminoglycans) 정량을 실시하였다. 탈세포 과정 후에 DNA는 대부분 제거되고 GAG는 실제 폐 조직과 비슷한 수준으로 존재하는 것을 확인하였다 (** $p < 0.01$ versus Before) (도 1 (A)).

[0078] 또한, 탈세포 과정 후의 조직을 H&E 조직학 분석을 통해 확인한 결과, 보라색으로 염색되는 세포핵이 대부분 제거된 것을 확인할 수 있으며 폐 조직의 특징적인 구조는 그대로 유지되어 있는 것을 확인하였다 (도 1 (B)).

[0079] 그리고, 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 성분을 기반으로 제작한 삼차원 하이드로젤의 내부 구조를 확인하기 위해 주사전자현미경 (scanning electron microscopy, SEM)을 이용해 분석한 결과 세포외기질 나노섬유 기반의 다공성 구조를 가지고 있어 오가노이드 배양을 위한 물질 교환에 적합한 구조적 특징 및 환경을 가지고 있음을

확인하였다 (도 1(C)).

- [0081] **실험예 1-2. 폐 오가노이드 배양을 위한 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 물성 분석**
- [0082] 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체가 폐 오가노이드를 배양하기에 적당한 물성을 가지고 있는지 확인하는 실험을 진행하였다.
- [0083] 구체적으로, 다양한 농도의 탈세포 폐 조직 세포외기질 성분을 기반으로 하이드로젤을 제작하고 유변학 분석을 통해 물성을 측정하였다.
- [0084] 그 결과, 도 2에서 확인되는 바와 같이, LuEM 농도가 높아질수록 물성은 증가하는 경향을 보였다. 기존의 배양 지지체로 많이 이용되는 매트릭셀의 경우도 100 Pa 이하의 물성을 지닌 것으로 보고되어 LuEM 하이드로젤의 물성이 폐 오가노이드 배양에 적합한 수준임을 확인하였다.
- [0086] **실험예 1-3. 폐 오가노이드 배양을 위한 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 단백질 분석**
- [0087] 탈세포 폐 조직 유래 LuEM 지지체에 함유된 세포외기질 성분을 확인하기 위해 질량분석기를 이용하여 단백질 분석을 실시하였다.
- [0088] 그 결과, 도 3에서 확인되는 바와 같이, 다양한 Collagens, Proteoglycans, Glycoproteins 등 많은 세포외기질 단백질 및 당단백질들이 탈세포 폐 조직 유래 LuEM 지지체에 포함되어 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 실제 폐 조직에 존재하는 이러한 폐 조직 특이적 인자들이 폐 오가노이드 배양에도 긍정적인 역할을 할 것으로 기대된다.
- [0090] **실험예 1-4. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 matrisome 단백질 종류 및 정량 분석**
- [0091] LuEM에 포함된 matrisome 단백질들을 질량 분석기를 이용한 단백질 분석을 통해 검출하여 종류별로 분류하였고, 상대적인 정량 분석을 진행하였다.
- [0092] 그 결과, collagen, glycoprotein, proteoglycan 등 다양한 종류의 세포외기질 matrisome 단백질들이 LuEM 지지체 내에 고르게 존재하는 것을 확인하였고, 실제 폐 조직에 존재하는 이러한 성분들이 폐 오가노이드 형성 및 발달을 증진시킬 수 있을 것으로 예측하였다 (도 4 (A) (B)).
- [0093] 단백질 상대 정량 분석을 통해 LuEM 지지체에 가장 많이 포함되어 있는 10가지 matrisome 단백질들을 확인해 보았을 때, 다양한 종류의 collagen, decorin, elastin, fibrinogen (alpha), biglycan 등의 단백질들이 많이 함유되어 있는 것을 확인하였다. 또한, 실제 폐 조직에 특이적으로 많이 존재한다고 알려진 matrisome 단백질들을 LuEM 지지체 내에서 확인해 보았을 때, 이들 중 4가지 단백질이 포함되어 있는 것을 확인하였다 (도 4(C)). LuEM에 포함된 이러한 다양한 matrisome 성분들이 폐 오가노이드 형성, 발달 및 분화를 증진시킬 수 있을 것으로 예측하였다.
- [0094] 따라서, 이러한 다양한 단백질 구성을 가진 LuEM 하이드로젤이 폐 조직 특이적 세포외기질 미세환경을 제공해 줌으로써 폐 오가노이드 배양을 위한 효과적인 지지체로 활용될 수 있을 것으로 예측하였다.
- [0096] **실험예 1-5. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 non-matrisome 단백질 분석**
- [0097] 본 발명의 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 non-matrisome 단백질을 분석하였다.
- [0098] 그 결과, LuEM에는 matrisome 뿐만 아니라 많은 양의 non-matrisome 단백질이 함유되어 있는 것을 확인하였다 (도 5 (A)). 그리고, 실제 폐 조직에 많이 함유되어 있다고 알려진 non-matrisome 단백질들을 확인해 보았을 때, 7종의 다양한 non-matrisome 단백질들이 LuEM 내에 함유되어 있는 것을 확인하였다 (도 5 (B)).
- [0100] 한편, Non-matrisome 단백질들을 GOBP (gene ontology biological process) 방법으로 분석하여, 어떠한 biological process와 관련된 단백질들이 많이 포함되어 있는지 분석하였다.
- [0101] 그 결과, 세포 성분 구성 및 발생 (cellular component organization or biogenesis), 세포 기관 구성 (organelle organization), 세포 골격 구성 (cytoskeleton organization) 등 조직의 형성과 발달에 관련된 기

능을 담당하는 단백질들을 특히 많이 함유하고 있는 것을 확인하였다 (도 5(C)).

[0102] 따라서, 이러한 non-matrisome 단백질들을 포함하고 있는 LuEM 지지체는 폐 오가노이드 형성 및 발달을 향상시킬 수 있을 것으로 예측하였다.

[0104] **실험예 1-6. 폐 조직의 탈세포 프로토콜 비교 분석**

[0105] 본 발명의 탈세포 방법 (Protocol 1)과, 기존 문헌에 보고된 바가 있는 탈세포 방법 (Protocol 2)을 비교하기 위한 실험을 진행하였다. 기존 문헌은 4% sodium deoxycholate을 4시간 처리한 후 DNase I을 이용하여 DNA를 제거하였고, 본 발명에서는 조직 내 단백질의 손상을 최소화하기 위해 더 완화된 조건인 1% Triton X-100과 0.1% ammonium hydroxide를 혼합한 용액만을 사용하였다.

[0106] 그 결과, 탈세포 공정 후 남은 DNA의 양을 비교해 보았을 때 두 가지 프로토콜 모두 DNA를 성공적으로 제거할 수 있는 것을 확인하였으나, GAG 정량을 통해 남아있는 세포외기질 성분을 비교해보면 프로토콜 1로 처리된 조직에서는 GAG 성분이 잘 보존되어 있는 반면 프로토콜 2로 처리된 조직에서는 남아있는 GAG 성분이 유의미하게 감소한 것을 확인하였다 (도 6(c)).

[0107] 그리고, 제작한 탈세포 폐 조직 유래 LuEM을 이용하여 하이드로젤을 제작한 후 물성을 측정하였고, 프로토콜 2로 처리된 탈세포 조직 유래 LuEM을 이용하여 제작한 하이드로젤의 물성이 다소 감소하였음을 확인하였다 (도 6(b)).

[0108] 또한, H&E 조직학 분석으로 비교해 본 결과, 두 방법 모두 세포는 잘 제거하였으나 프로토콜 1로 처리된 조직에서 ECM 단백질들이 더 많이 남아있는 것을 확인하였다 (도 6(c)).

[0109] 그리고, 각 탈세포 프로토콜로 제작된 LuEM 지지체의 단백질 분석을 실시한 결과, 프로토콜 1로 처리된 조직이 프로토콜 2로 처리된 조직 보다 더 많은 개수의 세포외기질 단백질을 포함하고 있음을 확인하였다 (도 6(d)).

[0110] 이를 통해, 본 발명에서 확립한 탈세포 방법이 기존의 방법보다 폐 조직의 세포외기질 단백질 보존에 보다 효과적이며, 따라서 프로토콜 1로 제작된 LuEM 하이드로젤이 폐 오가노이드 배양을 위해 보다 적합한 지지체로 적용될 수 있을 것으로 예측하였다.

[0112] 또한, 본 발명의 탈세포 방법 (Protocol 1)과 기존에 많이 적용되는 탈세포 방법 (Protocol 3)을 비교하기 위한 실험을 진행하였다. 구체적으로, 프로토콜 3는 본 발명의 탈세포 방법 이후에 탈세포 시약으로 많이 쓰이는 3% sodium dodecyl sulfate 시약을 추가로 24시간 처리하였다.

[0113] 그 결과, 탈세포 공정 후 남은 DNA의 양을 비교해 보았을 때 두 가지 프로토콜 모두 DNA를 성공적으로 제거할 수 있는 것을 확인하였으나, GAG 정량을 통해 남아있는 세포외기질 성분을 비교해보면 프로토콜 1로 처리된 조직에서는 GAG 성분이 잘 보존되어 있는 반면 프로토콜 3으로 처리된 조직에서는 남아있는 GAG 성분이 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있음 (도 7(a)).

[0114] 또한, 제작한 탈세포 폐 조직 유래 LuEM을 이용하여 하이드로젤을 제작한 후 물성을 측정하였고, 각 프로토콜로 제작한 하이드로젤의 물성은 큰 차이가 없는 것을 확인하였다 (도 7(b)).

[0115] 그리고, H&E 조직학 분석으로 비교해 본 결과, 두 방법 모두 세포는 잘 제거하였으나 프로토콜 1로 처리된 조직에서 ECM 단백질들이 더 많이 남아있는 것을 확인하였다 (도 7(c)).

[0116] 또한, 각 탈세포 프로토콜로 제작된 LuEM 지지체의 단백질 분석을 실시한 결과, 프로토콜 1로 처리된 조직이 프로토콜 3으로 처리된 조직 보다 약간 더 많은 개수의 세포외기질 단백질을 포함하고 있음을 확인하였다 (도 7(d)).

[0117] 이를 통해, 본 발명에서 확립한 탈세포 방법이 sodium dodecyl sulfate (SDS) 시약을 사용하는 방법보다 폐 조직 세포외기질 단백질의 보존에 더 효과적이며, 따라서 프로토콜 1로 제작된 LuEM 하이드로젤이 폐 오가노이드 배양을 위해 보다 적합한 지지체로 적용될 수 있을 것으로 예측하였다.

[0119] **실험예 2: 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 분석**

[0120] **실험예 2-1. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 농도별 생쥐 폐 오가노이드 형성 분석**

[0121] 다양한 농도의 LuEM 성분을 기반으로 탈세포 폐 조직 유래 하이드로젤을 제작하고 폐 오가노이드를 배양하였다. 배양 7일차에 각 조건에서 폐 오가노이드의 형성효율을 비교 분석하였다. 상용화된 배양 지지체인 매트릭셀

(MAT)을 대조군으로 이용하고, 폐 오가노이드는 생쥐의 폐 조직에서 추출한 줄기세포들을 이용하여 제작하였다.

[0122] 4가지 농도의 LuEM 하이드로젤 조건에서 폐 오가노이드를 배양 시도하였다. 3 mg/ml 농도 이상 조건에서는 MAT 조건과 비슷한 모양으로 오가노이드가 형성되는 것을 확인하였지만, 1 mg/ml의 농도는 낮은 물성으로 인해 대부분의 오가노이드가 가라앉아 배양접시 바닥에 붙어서 자라는 것을 확인하였다 (도 8 (A)). 따라서 1 mg/ml의 LuEM 농도는 폐 오가노이드 배양 지지체로 적절치 않음을 확인하여 이후 실험에서는 1 mg/ml 조건은 제외하고 진행하였다.

[0123] 각 하이드로젤 조건에서 형성 효율을 비교한 결과, 3 mg/ml LuEM 농도 이상의 하이드로젤에서 대조군인 매트릭셀에 비해서는 다소 낮은 형성 효율을 확인하였다. 그러나 대부분의 LuEM 조건에서 75% 이상의 오가노이드 형성 효율을 유도하여 LuEM 하이드로젤이 폐 오가노이드 배양에 문제없이 적용될 수 있음이 검증되었다 (** $p < 0.01$ versus MAT) (도 8 (b)).

[0125] **실험예 2-2. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 농도별 생쥐 폐 오가노이드 분화도 분석**

[0126] 다양한 농도의 LuEM 성분을 기반으로 탈세포 폐 조직 유래 하이드로젤을 제작하여 폐 오가노이드 배양에 적용하였다. 배양 7일차에 폐 세기관지 조직 관련 4가지 유전자의 발현을 비교 분석하였고, 상용화된 배양지지체인 매트릭셀(MAT)을 대조군으로 이용하였다.

[0127] 그 결과, 도 9에서 확인되는 바와 같이, Basal cell 관련 유전자인 *Krt5*는 LuEM 하이드로젤에서 배양된 폐 오가노이드에서 대조군에 비해 크게 높은 수준의 발현양을 보이는 것을 확인하였다. 3, 5, 7 mg/ml LuEM 하이드로젤 그룹 간 발현양은 큰 차이는 없었다.

[0128] 그리고, Goblet cell 관련 유전자인 *Muc5ac*와 Club cell에서 발현되는 유전자인 *Scgb1a1*은 7 mg/ml 농도의 LuEM 하이드로젤에서 가장 높은 발현을 보여주는 것을 확인하였다.

[0129] Ciliated cell 관련 유전자인 *Foxj1*은 대조군을 포함한 모든 하이드로젤 조건에서 비슷한 수준의 발현양을 확인하였다 (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus MAT).

[0130] 따라서, LuEM 하이드로젤에서 폐 오가노이드 배양은 폐 세기관지 분화 관련 유전자의 발현을 증진시키거나 비슷한 수준으로 유지하는 것을 확인하였다. 이 중에서 7 mg/ml 농도의 LuEM 하이드로젤 그룹은 전체적으로 유전자 발현에서 가장 높은 수준을 보였기에 이 농도의 LuEM 하이드로젤이 기존 매트릭셀에 비해 오가노이드의 폐 세기관지 조직으로의 분화를 더욱 증진시킬 수 있는 지지체로 이용 가능할 것으로 예측하였고, 이에 7 mg/ml LuEM 조건으로 농도를 고정하여 이후의 실험을 진행하였다.

[0132] **실험예 2-3. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)와 매트릭셀에서 배양한 생쥐 폐 오가노이드의 특이적 마커 단백질 발현 비교 분석**

[0133] 탈세포 폐 조직 유래 LuEM 하이드로젤에서 배양한 폐 오가노이드에서 다양한 폐 조직 특이적 단백질을 면역염색을 통해 분석하였다.

[0134] 구체적으로, 기존의 배양 지지체인 매트릭셀에서 배양한 폐 오가노이드와 배양 7일차에 비교하였다. 본 실험은 앞서 가장 적합한 조건으로 확인된 7 mg/ml LuEM 하이드로젤을 이용하였고 매트릭셀은 대조군으로 이용하였다.

[0135] 그 결과, 도 10에서 확인되는 바와 같이, 폐 조직에 존재하는 다양한 세포 종류인 Club cell (CC10), Goblet cell (MUC5AC), Basal cell (P63)이 두 조건에서 배양된 오가노이드에 모두 발현됨을 확인하였고 세포 증식과 관련 있는 KI67 단백질과 폐 전구체 세포(progenitor cell)에서 발현되는 단백질인 Sox9도 두 조건의 오가노이드에 모두 발현됨을 관찰하여 폐 오가노이드 내 세포가 활발히 증식하고 있는 것을 확인하였다. 또한, cell-cell interaction과 cytoskeleton과 관련된 E-cadherin (ECAD)과 F-actin의 염색을 통해 세포들이 유기적으로 연결되어 오가노이드를 구성하고 있는 것을 확인하였다.

[0137] **실험예 2-4. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)와 매트릭셀에서 배양한 생쥐 폐 오가노이드의 기능성 분석**

[0138] 탈세포 폐 조직 유래 LuEM 하이드로젤에서 배양한 폐 오가노이드에서 약물에 의한 팽윤 현상 관찰을 통해 기능성을 비교 분석하였다. CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 길항제 (agonist)인 포스콜린 (Forskolin, 이온 채널을 개방하도록 자극하여 수분의 배출을 촉진하는 화합물질) 처리하여 시간에 따른 폐 오가노이드의 팽윤 정도를 관찰하였고, 매트릭셀은 대조군으로 이용하였다.

- [0139] 그 결과, 도 11에서 확인되는 바와 같이, LuEM 하이드로젤 지지체에서 배양한 폐 오가노이드가 forskolin 처리 이후 시간에 따라 오가노이드가 팽창하는 것을 확인하였다. 매트릭셀에서 배양된 폐 오가노이드와 비교하여 더 팽창이 잘 되는 것을 확인하였다. 이를 통해 LuEM 하이드로젤에서 배양된 폐 오가노이드가 매트릭셀에서 배양한 폐 오가노이드와 유사한 수준의 기능성을 가지고 있음을 알 수 있다.
- [0141] **실험예 2-5. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 장기 배양한 생쥐 폐 오가노이드 분석**
- [0142] 본 발명의 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 장기 배양한 생쥐 폐 오가노이드를 분석하였다.
- [0143] 구체적으로 탈세포 LuEM 하이드로젤과 매트릭셀에서 93일까지 폐 오가노이드를 장기 배양하면서 확보한 오가노이드 형태 이미지에서 확인되는 바와 같이 (도 12 (A)), 초기에는 속이 빈 구조를 가지고 있다가 배양이 지속되면서 속이 꽉 찬 구조로 바뀌는 것을 관찰하였다. 매트릭셀은 대조군으로 이용하였다.
- [0144] 또한, 각 배양 지지체에서 계대 배양을 17번까지 진행하면서 150일까지 장기 배양한 폐 오가노이드의 세포 분포를 확인하기 위해 CC10 (club cell), acetylated α -tubulin (ciliated cell), P63 (basal cell)으로 면역염색 분석을 실시한 결과, LuEM 하이드로젤에서 배양된 폐 오가노이드 내에서 다양한 폐 조직 세포 구성이 150일차까지 유지되고 있는 것을 확인하였다. 또한, cytoskeleton 마커인 F-actin도 잘 발현되는 것을 확인하였다 (도 12 (B)).
- [0145] 배양 150일차에 qPCR을 통해 *Krt5* (basal cell), *Muc5ac* (goblet cell)의 발현을 비교해 보았을 때, LuEM 하이드로젤에서 배양된 폐 오가노이드가 매트릭셀에서 배양된 오가노이드 보다 유의미하게 높은 수준의 발현을 보여주는 것을 확인하였다 ($*p < 0.05$ and $***p < 0.001$ versus MAT) (도 12 (C)).
- [0146] 이러한 결과를 통해 LuEM 하이드로젤을 이용하면 기존의 매트릭셀과 유사하거나 더욱 뛰어난 수준으로 생쥐 폐 오가노이드 배양이 가능한 것을 확인하여 매트릭셀 대체재로서의 가능성이 검증되었다.
- [0148] 또한, LuEM 하이드로젤에서 계대 배양을 각각 1, 3, 7번 진행한 폐 오가노이드에서 *Krt5* (basal cell), *Muc5ac* (goblet cell), *Scgb1a1* (club cell)의 발현을 비교해 보았을 때, 계대 배양이 진행될수록 각 마커의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해, LuEM 하이드로젤에서 배양을 계속 진행할수록 폐 오가노이드의 분화가 더욱 증진되는 것을 확인하였다 (도 13).
- [0149] 이러한 결과를 통해, LuEM 하이드로젤을 이용하면 배양이 지속될수록 특정 세포들의 분화가 증진되어, 기존 배양 지지체보다 더욱 우수한 폐 오가노이드를 제작할 수 있는 가능성을 확인하였다.
- [0151] **실험예 2-6. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 조직 특이적 효과 확인**
- [0152] LuEM 하이드로젤에 포함된 조직 특이적 단백질들이 폐 오가노이드 배양에 있어 조직 특이적 효과를 보여주는지 확인하기 위해, 다른 장기 유래 탈세포 지지체에서도 폐 오가노이드를 배양하고 비교하는 실험을 진행하였고, 각 조직 유래 하이드로젤에서 폐 오가노이드를 7일 간 배양한 후 분석을 진행하였다.
- [0153] 구체적으로, 폐, 근육, 신장 유래 탈세포 지지체를 이용하여 폐 오가노이드를 배양 시도하였다. 폐 및 근육 유래 탈세포 지지체에서는 대조군인 매트릭셀 그룹과 비슷한 크기로 잘 배양이 되는 반면, 신장 유래 탈세포 지지체에서 오가노이드의 크기가 작게 형성되는 것을 확인하였다 (도 14 (A)).
- [0154] 형성 효율을 정량 분석해 보았을 때 폐와 근육 유래 탈세포 지지체는 비슷한 형성 효율을 보이는 것을 확인한 반면, 신장 조직 유래의 탈세포 지지체는 다른 탈세포 지지체에 비해 형성 효율이 감소하는 것이 관찰되었다 ($***p < 0.01$ versus MAT) (도 14(B)).
- [0155] 각 장기 유래 탈세포 지지체에서 7일동안 배양된 폐 오가노이드에서 *Krt5* (Basal cell), *Muc5ac* (goblet cell), *Scgb1a1* (club cell)의 발현을 비교한 결과, Basal cell의 발현은 폐 유래 탈세포 지지체에서 배양된 오가노이드가 가장 우수하였고, 근육 유래 탈세포 지지체에서는 club cell의 발현이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다 ($**p < 0.01$ versus NT) (도 14 (C)).
- [0156] 본 실험을 통해 폐 오가노이드 배양에 있어 LuEM 하이드로젤이 다른 장기 유래 탈세포 지지체에 비해 우수하였고, 조직 특이적 효과를 확인할 수 있다.

- [0158] 실험예 2-7. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)를 이용한 인간 폐 오가노이드 배양
- [0159] 탈세포 폐 조직 유래 LuEM 하이드로젤을 이용하여 생쥐 폐 오가노이드 뿐만 아니라 인간 폐 오가노이드도 배양도 가능한지 실험을 진행하였다.
- [0160] 구체적으로, 인간 폐 조직으로부터 줄기세포를 추출하여 탈세포 LuEM 하이드로젤 지지체에서 폐 오가노이드 배양을 시도한 결과, LuEM 하이드로젤에서도 인간 폐 오가노이드가 형성되고 잘 성장함을 확인하였다. 생쥐 폐 오가노이드 보다는 상대적으로 느리게 성장하였지만 계대 배양 및 장기 배양도 가능한 것을 확인하였다 (도 15 (A)).
- [0161] 배양한 인간 폐 오가노이드에서 폐 조직 마커 단백질 발현을 면역염색을 통해 확인한 결과, Basal cell에서 발현되는 P63 단백질과 Goblet cell에서 발현되는 단백질인 MUC5AC에 대한 면역염색을 진행하였을 때, 폐 오가노이드 내 P63, MUC5AC 단백질을 발현하는 세포들이 관찰되었다. 또한, ZO-1과 F-actin의 발현으로 폐 오가노이드의 내강 (lumen)이 잘 형성되어 있고, 구조가 유기적으로 잘 연결되어 있는 것을 확인할 수 있다 (도 15 (B)).
- [0162] 인간 폐 오가노이드에서 forskolin에 의한 팽창 반응을 확인하는 기능성 분석을 실시한 결과 약물을 처리한 후 시간에 따라 폐 오가노이드가 팽창하여, 정상적으로 기능을 하는 것을 확인하였다 (도 15 (C)).
- [0163] 본 실험 결과를 통해서 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체를 이용하여 인간 폐 오가노이드도 배양이 가능한 것을 확인하였다.
- [0165] 실험예 3: 본 발명 지지체 조성물의 활용 가능성 확인
- [0166] 실험예 3-1. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 생쥐 폐 오가노이드를 이용한 폐 섬유증 모델 제작
- [0167] 폐 오가노이드를 이용한 폐 질환 모델링을 위해 생쥐 폐 오가노이드에 TGF- β 를 처리하여 폐 섬유증 유발 가능성을 확인하였다.
- [0168] 구체적으로, 폐 오가노이드 배양 4일차에 각 농도별로 3일 간 처리해주었고, 7일차에 분석하였고, TGF- β 처리하지 않은 폐 오가노이드 (NT, No treatment)를 대조군으로 이용하였다.
- [0169] 그 결과, 폐 섬유증 모델을 제작하기 위해 TGF- β 를 농도별로 처리하고 3일 후 관찰하였을 때 TGF- β 처리를 하지 않은 폐 오가노이드는 3일간 잘 성장하였으나, TGF- β 를 처리한 폐 오가노이드는 모두 형태가 변하고 성장이 잘 일어나지 않은 것을 확인하였다 (도 16 (A)).
- [0170] 폐 섬유증 관련 마커인 *Col1a2*의 발현을 확인해본 결과, TGF- β 처리 농도가 높아질수록 *Col1a2*의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 40 ng/ml 농도로 처리해준 경우 통계적으로 유의미하게 *Col1a2*의 발현이 증가한 것을 확인하였다 (* $p < 0.05$ versus NT) (도 16 (B)).
- [0171] 섬유증 관련 단백질인 smooth muscle actin (SMA)과 collagen type 1 (Col1)의 발현을 면역염색을 통해 확인한 결과, TGF- β 처리 농도가 높을수록 섬유증 마커 발현양이 증가하는 것을 확인하였다 (도 16 (C)).
- [0172] 본 실험을 통해 LuEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 폐 오가노이드를 기반으로 하는 폐 섬유증 모델의 제작 가능성을 확인하였다.
- [0174] 실험예 3-2. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 인간 폐 오가노이드를 이용한 인간 폐 섬유증 모델 제작
- [0175] 탈세포 LuEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 인간 폐 오가노이드를 이용한 폐 섬유증 모델링 제작을 위해 인간 폐 오가노이드에 TGF- β 를 처리하여 폐 섬유증 유발 가능성을 확인하였다.
- [0176] 구체적으로, 각 지지체에서 배양한 인간 폐 오가노이드에 TGF- β 를 3일간 처리한 후 분석하였다.
- [0177] 폐 섬유증 마커인 *ACTA2*, *COL1A2*, *TNF- α* 의 발현을 정량적 PCR 분석을 통해 확인한 결과, TGF- β 처리한 오가노이드에서 발현이 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다 (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus NT) (도 17 (A)).
- [0178] TGF- β 를 처리하고, 3일 후 폐 섬유증 마커인 smooth muscle actin (SMA), collagen type 1 (COL1), Vimentin (VIM)의 발현을 면역염색을 통해 확인한 결과 TGF- β 처리한 폐 오가노이드에서 모든 마커의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (도 17 (B)).

- [0179] 본 실험 결과를 통해 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 (LuEM) 지지체에서 배양된 인간 폐 오가노이드를 이용한 인간 폐 섬유증 모델의 제작 가능성을 확인하였다.
- [0181] **실험예 3-3. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 제작된 인간 폐 섬유증 모델의 기능성 분석**
- [0182] 탈세포 LuEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 인간 폐 오가노이드에 TGF- β 를 처리하여 폐 섬유증 모델을 제작하고, forskolin 약물에 따른 팽윤 정도를 분석하여 기능성을 확인하였다.
- [0183] 그 결과, 도 18에서 확인되는 바와 같이 정상 오가노이드는 약물에 의해 정상적으로 팽윤 현상이 일어나지만, 폐 섬유증이 유발되면 약물을 처리해도 폐 오가노이드가 팽창하지 않는 것을 확인하였다.
- [0184] 본 실험 결과를 통해, 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 (LuEM) 지지체에서 배양된 인간 폐 섬유증 모델의 기능성 감소를 확인하였다.
- [0186] **실험예 3-4. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 생쥐 폐 오가노이드를 이용한 미세먼지 질환 모델 제작**
- [0187] 탈세포 LuEM 지지체 내에 배양된 폐 오가노이드에 미세먼지를 처리하여 폐 오가노이드에 대한 미세먼지 영향을 분석하였다.
- [0188] 구체적으로, 탈세포 폐 조직 유래 LuEM 성분으로 하이드로젤을 제작할 때, 크기가 10 μ m 정도인 미세먼지 (Particulate Matter, PM10)를 혼합하여 하이드로젤 내에서 배양되고 있는 폐 오가노이드에 미세먼지가 효과적으로 접촉할 수 있도록 하였고, 미세먼지와 함께 오가노이드 배양 후 3일째에 유전자 발현 분석을 진행하였다.
- [0189] 그 결과, 미세먼지가 처리된 LuEM 지지체에서 3일간 배양된 폐 오가노이드 이미지를 살펴보았을 때, 미세먼지로 추정되는 검은색 물질(화살표)들이 관찰되는 것을 확인하였다 (도 19 (A)).
- [0190] 미세먼지가 처리된 폐 오가노이드에서, 염증반응과 관련된 유전자인 *iNOS* 발현이 4 mg/ml 농도로 미세먼지가 처리된 경우에 증가하는 것을 확인하였다 (도 19 (B)).
- [0191] 본 실험결과를 통해 탈세포 LuEM 하이드로젤 지지체에 폐 오가노이드를 배양하면서 미세먼지를 추가하는 방식으로 미세먼지에 의한 폐 질환 모델링의 가능성을 확인하였다.
- [0193] **실험예 3-5. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 장기 보관 가능성 검증**
- [0194] 탈세포 폐 조직 유래 LuEM 용액을 4℃에서 장기간 냉장 보관하고, 이를 생쥐 폐 오가노이드 배양에 이용하여 LuEM 하이드로젤의 장기 보관 가능 여부 및 안정성을 확인하였다 (도 20 (A)).
- [0195] 배양 직전에 새롭게 제작한 LuEM 하이드로젤 (Fresh LuEM) 및 매트릭셀과 비교하여, 7일 및 31일간 냉장 보관된 LuEM으로 제작한 하이드로젤에서도 마찬가지로 폐 오가노이드가 잘 형성이 되며 배양이 잘 되는 것을 확인하였다 (배양 7일째 오가노이드 이미지). 또한, 배양 7일차에 qPCR 분석을 통해 다양한 폐 특이적 마커의 mRNA 발현량을 비교해 보았을 때, 매트릭셀에서 배양된 오가노이드 (MAT 그룹) 보다는 발현이 높고, 새롭게 제작한 LuEM 하이드로젤에서 배양된 오가노이드 (Fresh 그룹)와 유사한 수준으로 발현되는 것을 확인하였다 (도 20 (B)).
- [0196] 이를 통해, 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체가 용액 형태로 4℃에 냉장 보관되어도 최소 1달까지 변성 없이 안정성을 잘 유지하며 냉장 보관 후에 폐 오가노이드 배양에 사용 가능함을 확인하였다. 장기간 보관이 가능함을 통해 유효기간이 긴 제품으로 개발될 수 있음을 검증하였다.
- [0198] **실험예 3-6. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 성분(Lung Extracellular Matrix, LuEM)을 이용하여 지지체 없는 배양 조건에서 폐 오가노이드의 형성 가능성 확인**
- [0199] 배양 지지체 없이 탈세포 폐 조직에서 유래한 세포외기질(LuEM) 용액을 배양액에 첨가한 조건에서 폐 오가노이드의 형성 가능성을 확인한 실험을 진행하였다.
- [0200] 구체적으로, 생쥐 폐 조직으로부터 분리한 줄기세포들을 배양할 때 배양액에 LuEM 용액을 농도별로 첨가하여 배양을 진행하였다.
- [0201] 배양 7일차에 관찰했을 때 LuEM 농도가 증가할수록 크기가 큰 오가노이드가 형성되는 것을 확인하였다. 그러나 고농도 (0.1 mg/ml) LuEM 조건에서 배양된 오가노이드에서는 일부 가교된 LuEM 하이드로젤 같은 물질들이 오가

노이드 주변에 붙어있는 것이 관찰되었다 (도 21 (A)).

[0202] 배양 7일차에 형성된 폐 오가노이드의 개수와 크기를 정량 해보았을 때, LuEM 농도가 높을수록 형성된 오가노이드의 개수가 증가하는 것을 확인하였고 중간 농도 (0.01 mg/ml) LuEM 처리 조건에서 배양된 폐 오가노이드가 평균적으로 가장 큰 크기를 가지는 것을 확인하였다 (도 21 (B)).

[0203] 이러한 결과를 통해 폐 오가노이드 형성 및 유지에 필수적인 매트리지나 하이드로젤 지지체 없이도 단순히 LuEM 용액을 배양액에 추가하는 방식만으로도 폐 오가노이드 배양이 가능함을 확인하였다. 이러한 방식을 이용하면 보다 쉽고 효율적으로 폐 오가노이드 배양이 가능하며 각종 인자들을 처리하고 오가노이드를 다루는데 훨씬 수월한 장점이 있어 오가노이드 응용 범위를 확장할 수 있다.

[0205] **실험예 3-7. 배양 지지체 없이 형성된 생쥐 폐 오가노이드의 유전자 및 단백질 발현 분석**

[0206] 다양한 농도의 LuEM 처리 조건에서 7일간 배양된 폐 오가노이드의 폐 조직 특이적 마커 발현을 비교하였다.

[0207] 구체적으로, 폐 세기관지 분화와 관련된 4가지 유전자와 폐포 관련 유전자의 발현을 각 그룹에서 비교하였다. 그 결과, 0.1 mg/ml 농도의 suspension 그룹은 젤 안에서 배양되는 오가노이드와 비슷한 발현을 보이는 것을 확인하였다. 반면 No treatment, 0.001, 0.01농도의 suspension 그룹은 ciliated cell (*Foxj1*) 및 club cell (*Scgbl1a1*)의 발현이 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다. Goblet cell (*Muc5ac*)의 발현은 LuEM 하이드로젤 조건과 비슷하고, Basal cell (*Krt5*)의 발현은 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해, suspension 조건에서 배양하면 basal cell로부터 다양한 세포로의 분화가 더욱 촉진되는 것을 확인할 수 있다 (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus No treatment, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus LuEM 7 mg/ml) (도 22 (A)).

[0208] 면역염색을 통해 ciliated cell (acetylated α -tubulin), basal cell (P63) 등 다양한 세포의 발현을 확인하였고, 배양 지지체 없이 배양을 하면 편극 (polarization) 현상이 일어나 내부와 외부가 뒤집힌 형태로 배양이 되는 것을 확인하였다. 그 결과, 0.1 mg/ml은 하이드로젤의 농도가 높아 젤 조건과 다름없이 편극 현상이 일어나지 않고 오가노이드 내부에 내강이 존재하는 것을 확인하였고, 나머지 그룹에서는 바깥쪽을 내강으로 인식하는 모양을 가지고 있는 것을 확인하였다 (도 22 (B)).

[0209] 본 실험 결과를 통해 배양 지지체 없이 LuEM 용액 처리만을 통해 효과적으로 폐 오가노이드를 제작하는 기술을 확립하였다. 또한, 이렇게 제작된 오가노이드는 기존의 지지체 내에서 배양된 오가노이드와 다르게 분극 (polarization) 현상이 생체 내 조건과 유사하게 일어나 내부와 외부가 뒤집힌 채로 형성됨을 확인하였다.

[0211] **실험예 3-8. 배양 지지체 없이 형성된 인간 폐 오가노이드의 단백질 발현 분석**

[0212] 10 mg/ml 농도의 LuEM 용액이 1:1000 비율로 (배양액 부피 대비) 첨가된 배양 조건 (최종 농도 0.01 mg/ml)에서 7일간 배양된 인간 폐 오가노이드의 폐 조직 특이적 마커 발현을 비교하였다. 대조군으로 아무 것도 처리하지 않은 그룹 (No treatment)과 매트리지 1:100 비율로 (배양액 부피 대비) 처리한 그룹 (MAT)을 비교하였다.

[0213] 그 결과 도 23에서 확인되는 바와 같이, LuEM을 적당한 농도로 처리해주면 여러 개의 오가노이드가 서로 결합하여, 더욱 큰 크기의 오가노이드가 형성됨을 확인하였다. 또한, 형성된 오가노이드는 내부와 외부가 바뀌어 있고, ciliated cell (acetylated α -tubulin), basal cell (P63), goblet cell (MUC5AC)의 발현이 모두 잘 일어나는 것을 확인하였다.

[0214] 본 실험 결과를 통해, 배양 지지체 없이 LuEM 용액의 처리만을 통해 크기가 더욱 커진 조직 수준의 인간 폐 오가노이드를 제작하는 기술을 확립하였다.

[0216] **실험예 3-9. 배양 지지체 없이 형성된 인간 폐 오가노이드의 단백질 발현 분석**

[0217] LuEM 하이드로젤 지지체에서 배양되던 인간 폐 오가노이드를 배양 지지체가 없는 조건으로 바뀌주면 내부와 외부가 바뀌어 배양되는 것을 확인하였다. 또한, COVID-19의 세포 내 감염에 중요한 세포 표면의 단백질로 알려진 angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)와 transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2)가 오가노이드 외부에 주로 발현되어 바이러스 감염 실험에 최적화된 형태로 배양되는 것을 확인하였다 (도 24).

[0218] 본 실험 결과를 통해, 배양 지지체 없이 배양된 폐 오가노이드가 감염 연구에 활용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0220] **실험예 3-10. 배양 지지체 없이 형성된 생쥐 폐 오가노이드의 미세먼지 처리 실험**

[0221] 배양 지지체 없이 LuEM 용액 처리만을 통해 형성된 폐 오가노이드에 4가지 농도 조건에서 미세먼지를 처리하고

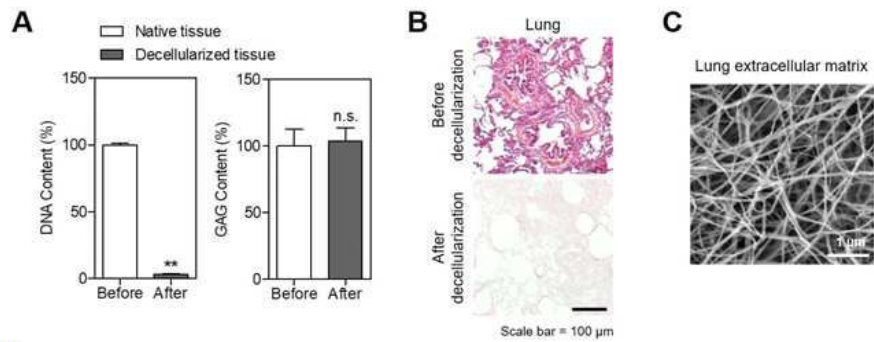
그에 대한 영향을 관찰하였다. 전술한 실험예에서 가장 좋은 효과를 보여준 0.01 mg/ml 농도의 LuEM 용액이 배양액에 포함된 조건으로 실험을 진행하였다. 본 실험에서는 외부 물질인 미세먼지를 배양액에 처리하였을 때 오가노이드가 미세먼지에 직접적으로 반응할 수 있어 보다 정확한 미세먼지에 대한 영향 분석이 가능하다.

- [0222] 크기가 10 μ m 정도인 미세먼지 (Particulate Matter, PM10)를 20, 100, 500 μ g/ml의 다양한 농도로 배양액에 처리한 결과, 미세먼지의 농도가 증가할수록 배양액에서 검은색으로 보이는 미세먼지(화살표)가 더 많이 관찰되었다. 또한, 오가노이드에 미세먼지가 직접 붙어있거나 미세먼지가 오가노이드 주변에 많이 분포하고 있는 것을 확인하였다 (도 25 (A)).
- [0223] 세포 생존율을 분석하는 Live/Dead 염색을 통해 미세먼지(화살표)의 농도가 높을수록 죽은 세포가 많아지는 것을 확인하였다. 특히 고농도 (500 μ g/ml) 조건에서는 세포 사멸로 인해 오가노이드가 해체되어 구조가 남지 않은 결과를 확인하였다 (도 25(B)).
- [0224] 본 실험 결과를 통해 미세먼지가 폐 오가노이드의 사멸을 유도하는 것을 확인하였고 배양 지지체 없이 형성된 폐 오가노이드에 미세먼지를 처리하는 방식을 이용하면 미세먼지에 의한 폐 질환 모델링이 보다 용이하며 정확한 미세먼지 영향 예측이 가능함을 확인하였다.
- [0226] **실험예 3-11. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)의 생쥐 폐 오가노이드의 폐포 분화 촉진**
- [0227] 폐에서 가장 중요한 기능적인 구조체 중 하나인 폐포 세포로 특이적으로 분화 증진된 오가노이드를 새롭게 구현하기 위해서, 노치 신호전달 (Notch signaling)을 조절하여 오가노이드 제작을 시도하였다. 분화 유도를 위해서 노치 신호전달을 억제하는 DAPT 시약을 기존의 배양액에 추가하여 배양하였고, LuEM의 농도 별로 하이드로젤을 제작하여 폐 오가노이드 배양 및 분화 유도를 시도하였고, 매트릭셀은 대조군으로 이용하였다.
- [0228] 배양 14일 차에 각 LuEM 하이드로젤 농도 조건에서 배양한 폐 오가노이드를 관찰하였을 때 모든 그룹에서 유사한 모양의 오가노이드가 잘 형성됨을 확인하였다 (도 26 (A)).
- [0229] 배양 14일 차에 폐포 특이적 마커인 *Sftpc*와 *Hopx*의 유전자 발현을 비교하였을 때 제2형 폐포상피세포 (Alveolar type 2 cell) 마커인 *Sftpc*는 LuEM의 농도가 높아질수록 발현양이 증가하였고, 제1형 폐포상피세포 (Alveolar type 1 cell) 마커인 *Hopx*는 LuEM의 농도가 낮아질수록 발현양이 증가하였음을 확인하였다. (** $p < 0.01$ versus MAT) (도 26 (B))
- [0230] 배양 14일 차에 제2형 폐포상피세포 (Alveolar type 2 cell) 마커인 SPC와 제1형 폐포상피세포 (Alveolar type 1 cell) 마커인 *Hopx*의 발현을 확인해 보았을 때, 다소 차이는 있지만 모든 그룹에서 각 마커들을 잘 발현하는 것을 확인하였다. 또한, 세기관지 (bronchiolar) 마커인 CC10과 P63의 발현은 거의 관찰되지 않는 것을 확인하였다 (도26 (C)).
- [0231] 본 실험결과를 통해 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 (LuEM) 지지체를 이용하여 폐포 세포로 분화 유도된 오가노이드의 제작이 가능함을 확인하였고, LuEM 농도 조절을 통하여 오가노이드의 세포 구성을 조절할 수 있음을 확인하였다.
- [0233] **실험예 3-12. 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 지지체(Lung Extracellular Matrix, LuEM)에서 배양된 인간 폐 오가노이드의 단일 세포층 (monolayer) 형성 및 분석**
- [0234] 감염 실험, 약물 스크리닝 등 다양한 활용을 위해 손쉽게 이용될 수 있도록 인간 폐 오가노이드로부터 단일 세포층 (monolayer)을 제작하는 실험을 진행하였다.
- [0235] 구체적으로, LuEM 하이드로젤에서 배양된 폐 오가노이드를 효소 처리를 통해 단일 세포로 해체한 뒤, well plate에 배양하여 단일 세포층 형성을 유도하였다.
- [0236] 제작된 단일 세포층 (monolayer)은 ciliated cell (acetylated α -tubulin), goblet cell (MUC5AC), basal cell (P63)이 잘 유지가 되고 있는 것을 면역염색을 통해서 확인하였다 (도 27 (A)). 또한, ACE2 및 TMPRSS2와 같은 COVID-19 감염에 중요한 세포 표면 단백질들을 단일 세포층을 구성하는 세포들이 잘 발현하고 있음을 확인하였다 (도 27(B)).
- [0237] 본 실험을 통해 탈세포 폐 조직 유래 세포외기질 (LuEM) 지지체를 이용하여 배양된 폐 오가노이드로부터 다양한 실험 용도로 적합한 단일 세포층을 형성하는 방법을 확립하였다.

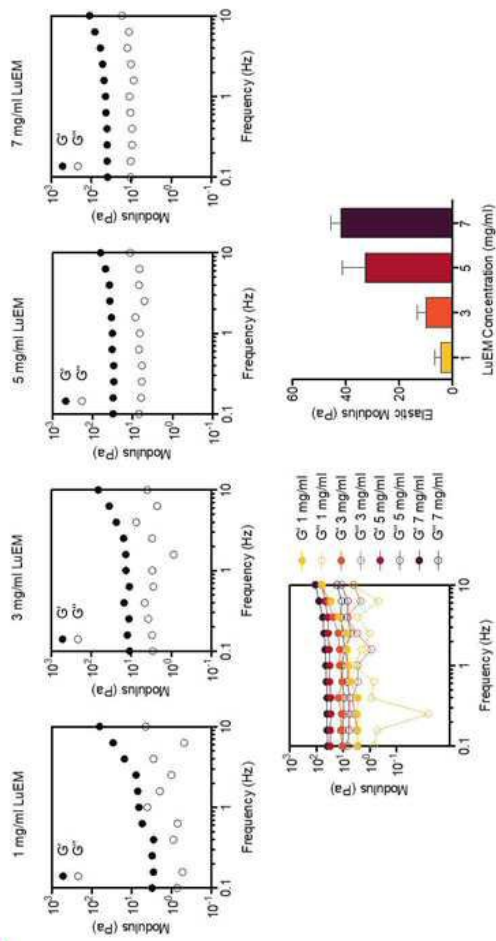
[0239] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1



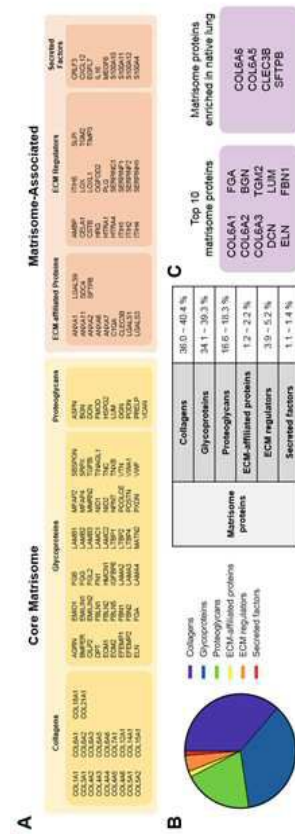
도면2



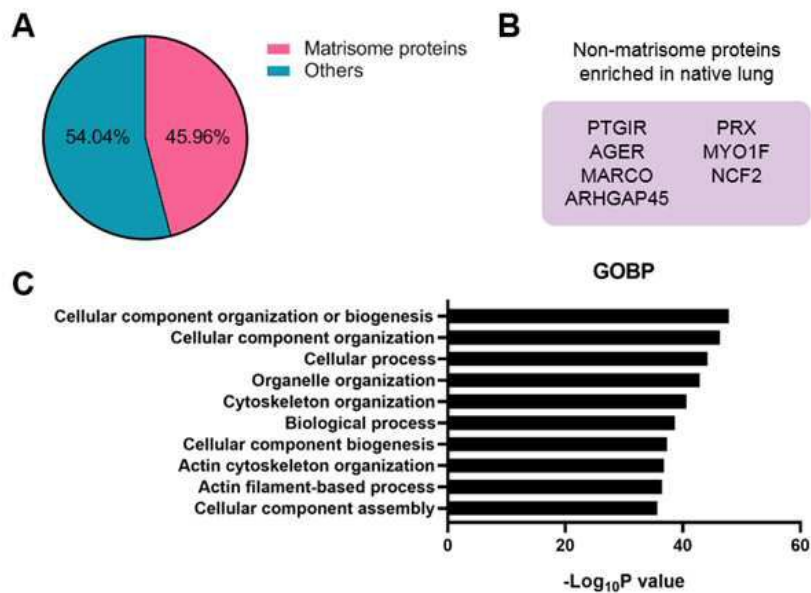
도면3

Lung	
Collagens	Collagen type I, alpha 1
	Collagen type IV, alpha 1, 2, 4, 6
	Collagen type VI, alpha 1, 2, 3, 5, 6
	Collagen type VIII, alpha 1
	Collagen type XII, alpha 1
	Collagen type XV, alpha 1
	Collagen type XIV, alpha 1
	Collagen type XVI, alpha 1
	Collagen type XVIII, alpha 1
	Collagen type XXI, alpha 1
Proteoglycans	Heparan sulfate
	Asporin
	Biglycan
	Decorin
	Fibromodulin
	Versican
Glycoproteins	Lumican
	Agrin
	Dermatopontin
	Elastin 13, 15, 24
	Emilin 1
	Fibronectin
	Fibrillin 1
	Laminin, alpha 3, 4, 5
	Laminin, beta 1, 2, 3
	Laminin, gamma 1, 2
	Nidogen 1, 2
	Thrombospondin
	Vitronectin
	Tenascin X
	Fibulin 1, 2, 5
	Fibrinogen, alpha chain
	Fibrinogen, beta chain
	Fibrinogen, gamma chain
	Hemicentin 1
Others	Mimcan
	Prolargin

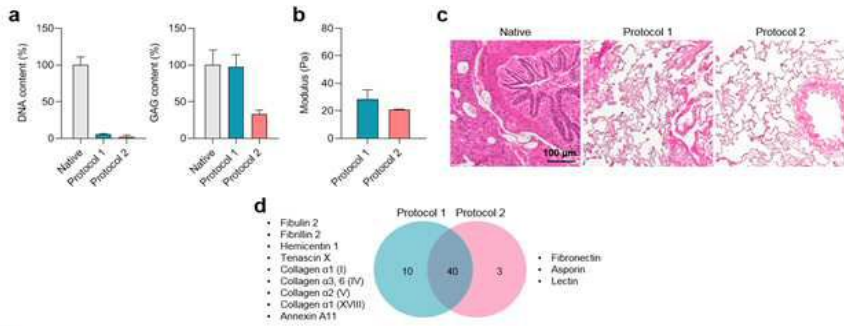
도면4



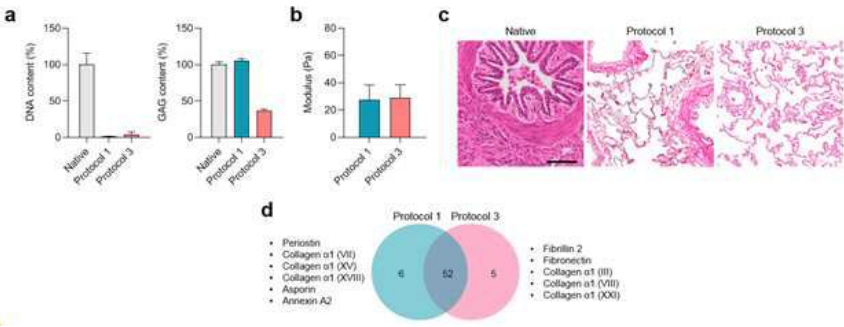
도면5



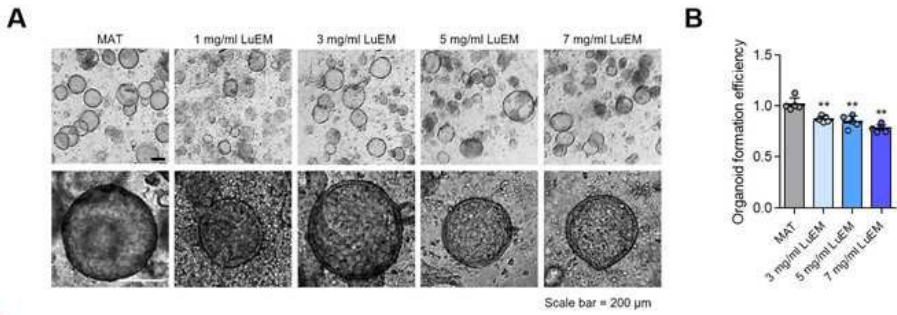
도면6



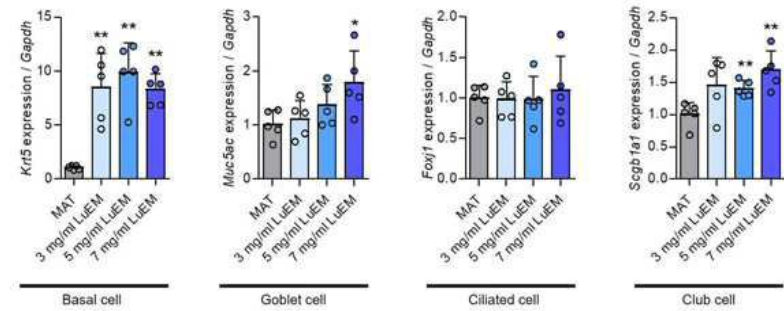
도면7



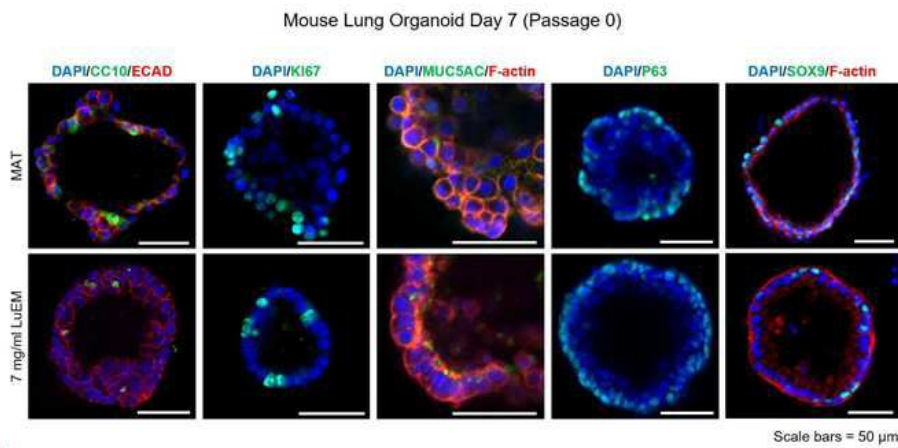
도면8



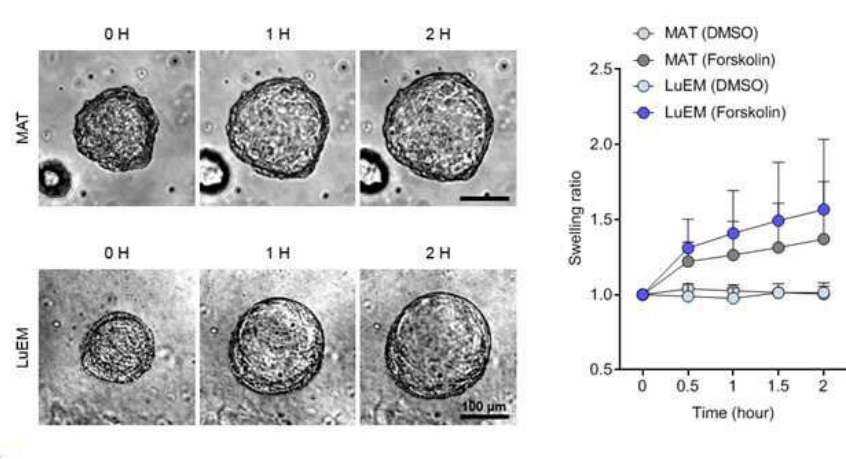
도면9



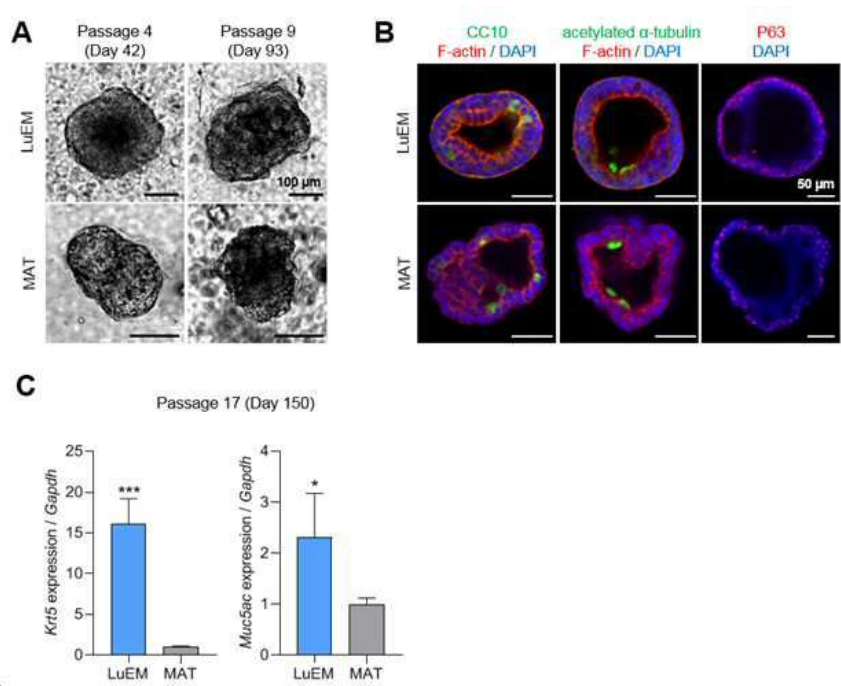
도면10



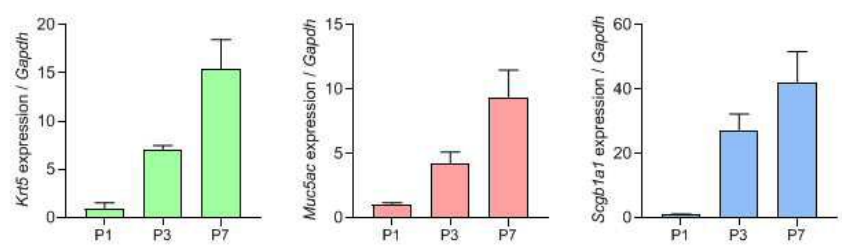
도면11



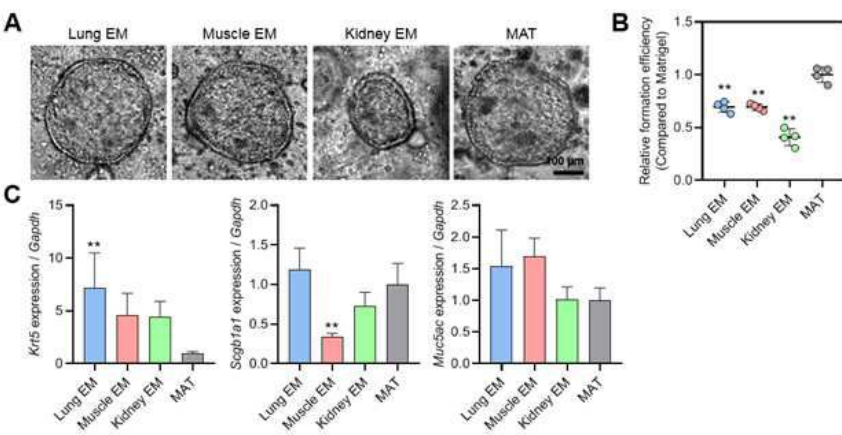
도면12



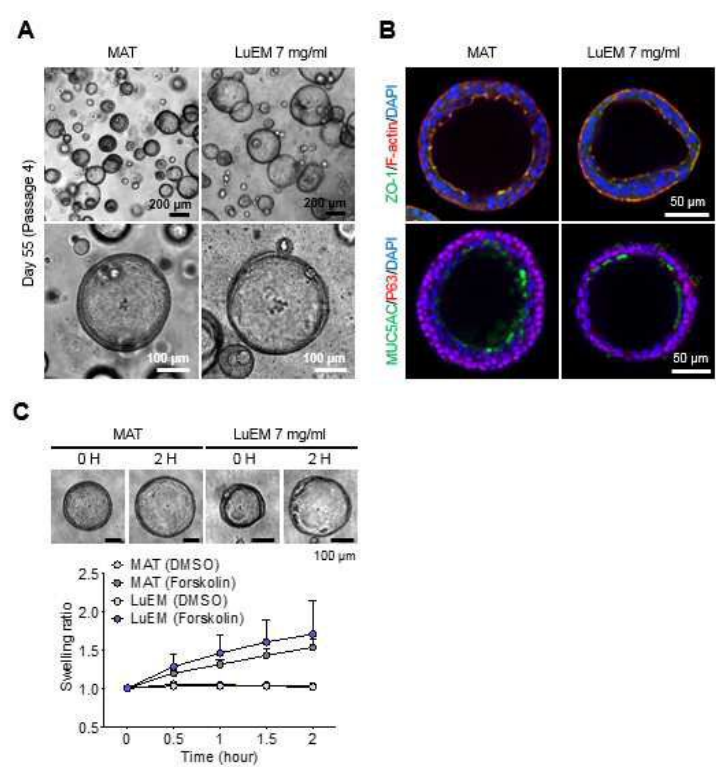
도면13



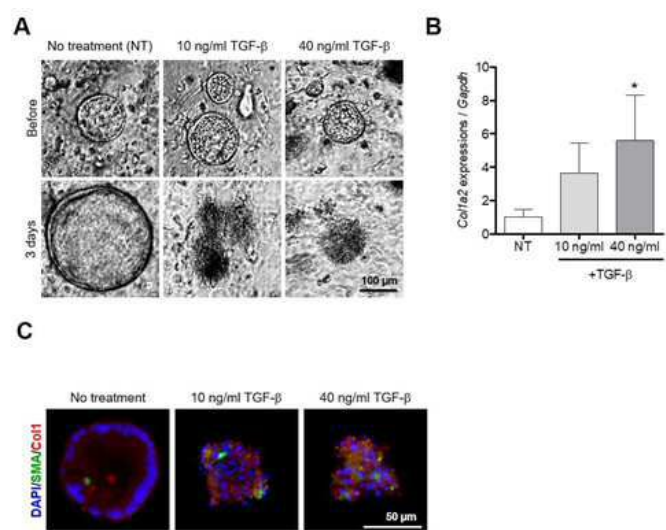
도면14



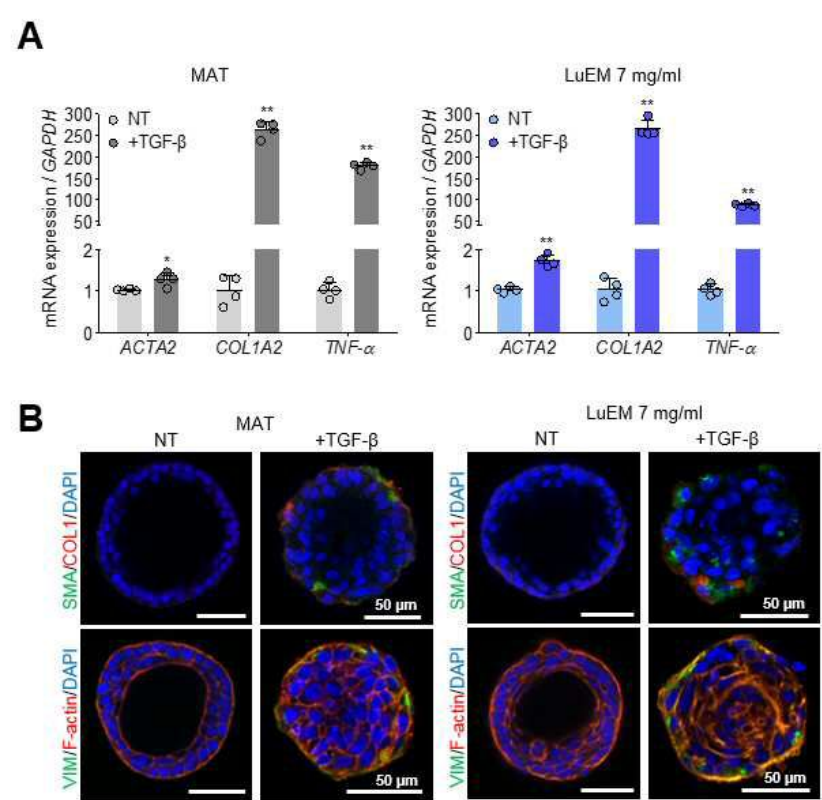
도면15



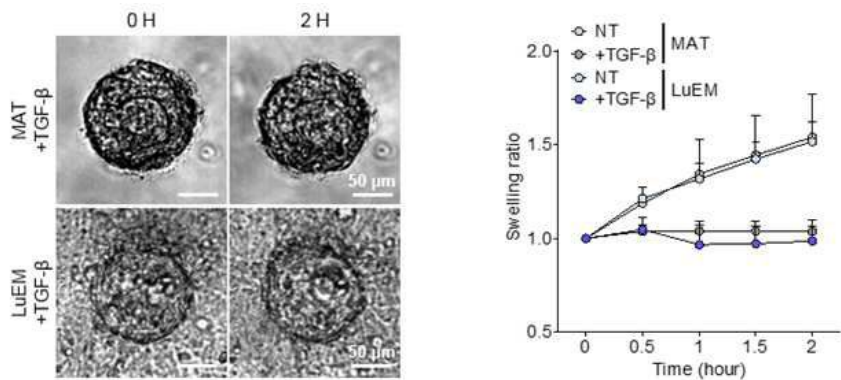
도면16



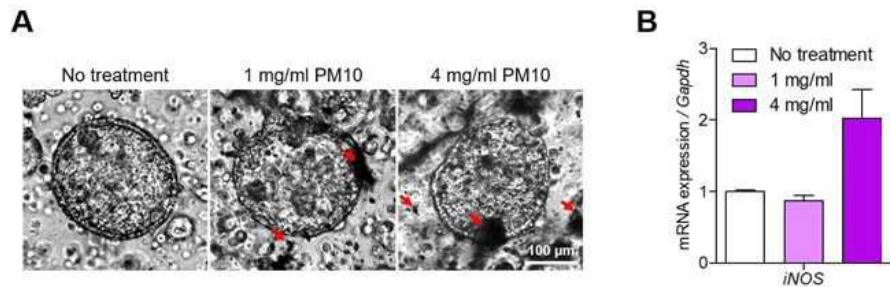
도면17



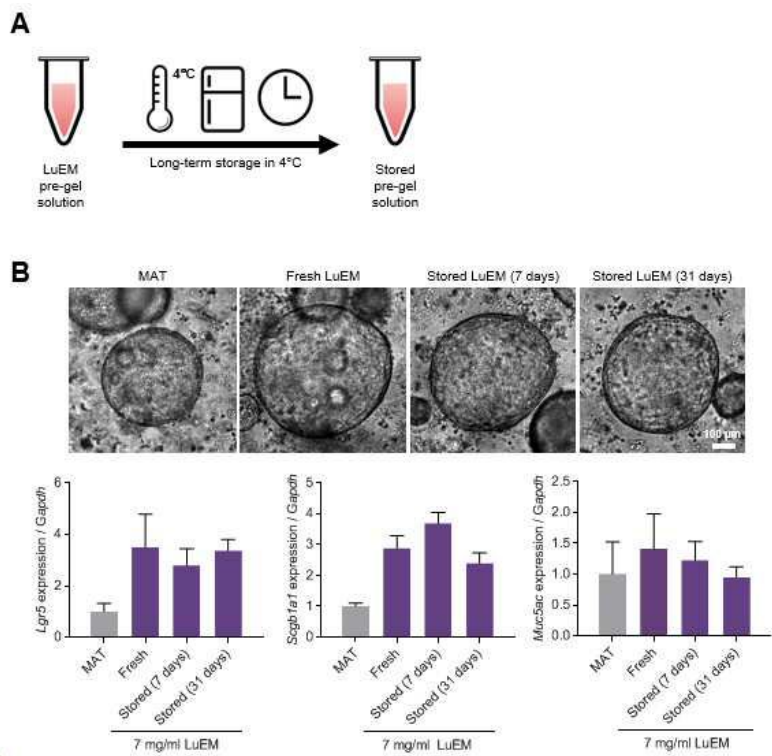
도면18



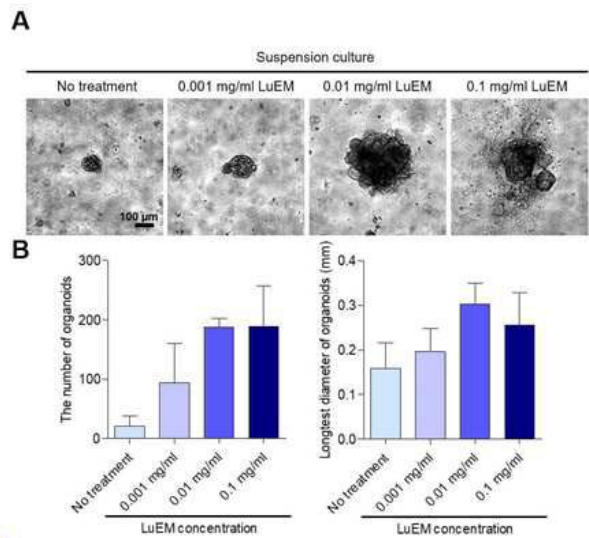
도면19



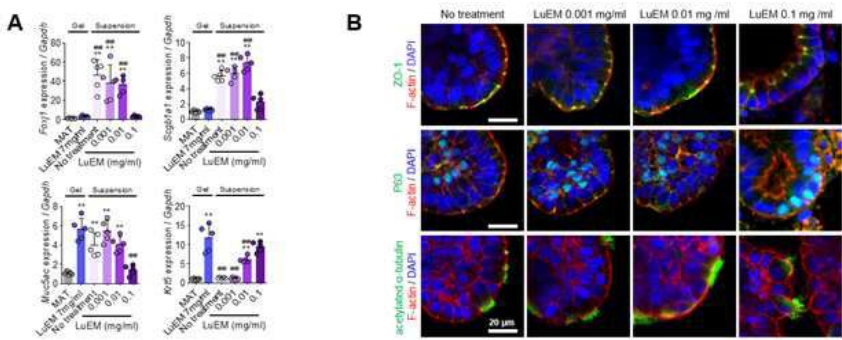
도면20



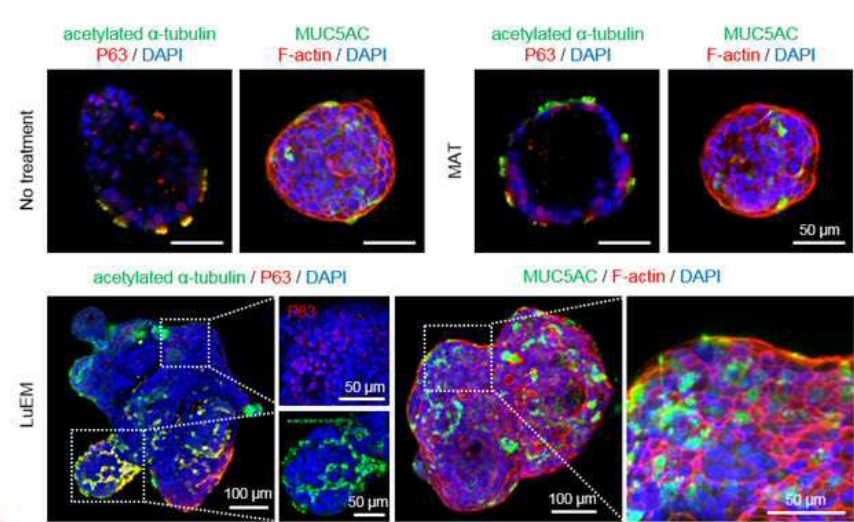
도면21



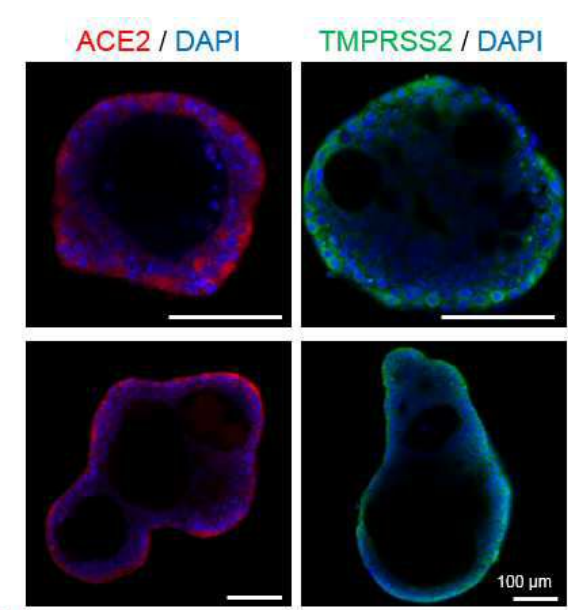
도면22



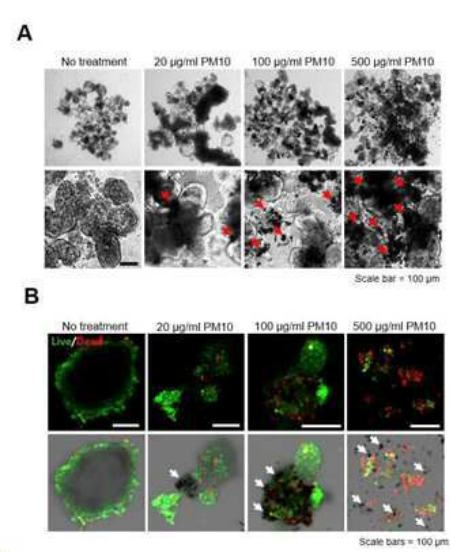
도면23



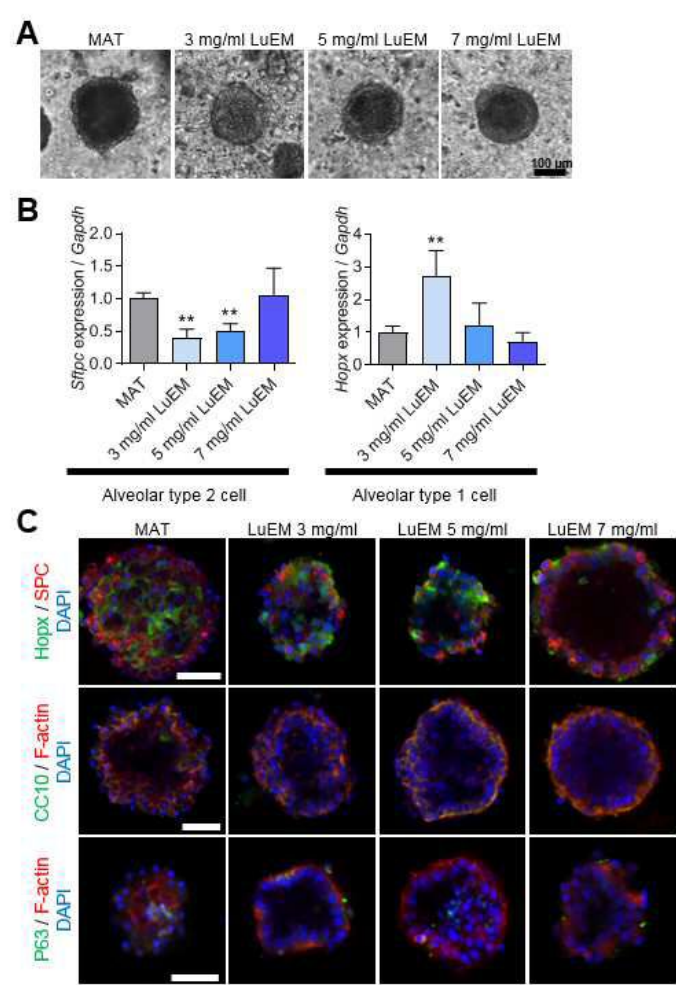
도면24



도면25



도면26



도면27

