



등록특허 10-2526785



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월27일

(11) 등록번호 10-2526785

(24) 등록일자 2023년04월24일

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

(52) CPC특허분류
C12N 5/0633 (2013.01)
C12N 5/0062 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0134353

(22) 출원일자 2020년10월16일

심사청구일자 2020년10월16일

(65) 공개번호 10-2022-0050548

(43) 공개일자 2022년04월25일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020200082352 A

Zoological Science, 2017, 34권, 페이지
475-483

Developmental Dynamics, 2017, 246권, 페이지
135-147

Developmental Dynamics, 2009, 238권, 페이지
724-731

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대
학교)

(72) 발명자

임재열

서울특별시 강남구 언주로63길 20, 연세대학교 의
과대학 미래의학연구센터 202호(역삼동)

윤여준

서울특별시 서대문구 신촌로27길 33, 4층(북아현
동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

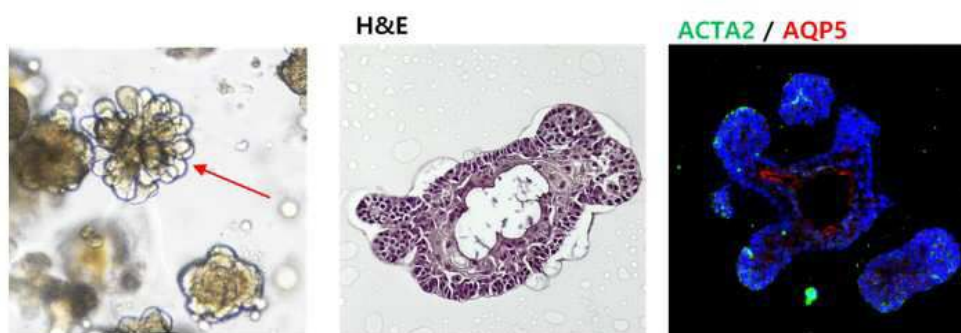
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 인간 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드의 성장 및 분화 유도용 배양액 조성물 및 이를 이용한 오가노이드 성숙 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드의 성장 및 분화 유도용 배양액 조성물 및 이를 이용한 오가노이드 성숙 방법에 관한 것으로, 상세하게는 인간 타액선 오가노이드의 성장 및 유지에 필수적인 뉴레굴린-1(Neuregulin-1; Nrg1)과 Vitamin A (Retinyl acetate, RA)가 첨가된 배양액 조성을 확립하였고, 이를 통하여 성장된 오가노이드의 분화 유도를 위해 Notch 억제제(DAPT) 등이 첨가된 배양액 조성으로 조직과 유사한 모양의 오가노이드를 시험관 내(in vitro) 3차원 배양을 통해 확립하였으며, 상기 오가노이드는 질환 모델링, 병리연구, 약물스크리닝, 독성평가, 유전자조작에 활용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12N 2500/38 (2013.01)

C12N 2500/40 (2013.01)

C12N 2500/46 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

(72) 발명자

김동현

서울특별시 서대문구 독립문로 62-6, 203호(냉천동)

황승연

서울특별시 서대문구 연세로 50-1(신촌동)

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

명세서

청구범위

청구항 1

뉴레귤린-1(Neuregulin-1; Nrg1) 및 비타민 A(Vitamin A)를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액; 및

최종 농도 7.5 내지 150 ng/mL의 Nrg1 및 Notch 억제제인 DAPT를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 분화 유도용 배양액을 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 배양액 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액은 표 1에 기재된 구성성분으로 이루어진 것을 특징으로 하는 배양액 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 분화 유도용 배양액은 표 2에 기재된 구성성분으로 이루어진 것을 특징으로 하는 배양액 조성물.

청구항 6

- (1) 타액선 조직으로부터 타액선 줄기세포를 분리하는 단계;
- (2) 상기 분리된 타액선 줄기세포를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계;
- (3) Nrg1 및 비타민 A(Vitamin A)를 유효성분으로 포함하는 배양액에 상기 ECM에 접촉된 타액선 줄기세포를 배양하여, 타액선 오가노이드로 성장시키는 단계;
- (4) 상기 성장된 타액선 오가노이드를 Nrg1이 포함된 배양액 조성물에 배양하는 단계; 및
- (5) 상기 (4) 단계의 타액선 오가노이드 배양액에 Notch 억제제인 DAPT를 첨가하고 추가 배양하여 타액선 오가노이드를 분화시키는 단계를 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 배양 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 배양된 타액선 오가노이드는 도관(Ductal) 마커인 CK5 및 CK7, 선방 세포(acinar cell) 마커인 SLC12A2 및 AQP5, 근상피세포(myoepithelial cell) 마커인 ACTA2와, Ki67 및 LGR5가 발현되는 것을 특징으로 하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 배양 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 인간 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드의 성장 및 분화 유도용 배양액 조성물 및 이를 이용한 오가노이드 성숙 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [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] 세포와 세포에서 유래한 오가노이드를 체외에서 더 오래 키우며, 세대 횟수를 늘릴 수 있고, 생체 모방적이게 만드는 것은 기존의 방법들에 비하여 단일 세포 또는 시작 단계의 세포들에서 더 많은 세포를 얻을 수 있음을 의미하여, 연구에 용이하게 만드는 것을 의미한다. 예를 들어, 약리 물질 선별 검사, 발생학 연구, 이식을 통한 기능 회복 등의 다양한 분야에 쓰일 수 있다.
- [0004] 세포를 증식 배지 (gland expansion medium)에서 키우는 것은 그들의 줄기세포 또는 전구 세포의 성질을 유지시키며 증식시킬 수 있다. 이 경우 오가노이드는 줄기세포 또는 전구세포로 구성된다. 따라서, 증식 배지에서 키우는 것은 증대된 양의 줄기세포 또는 전구세포, 그리고 이러한 세포들을 포함하고 있는 오가노이드를 얻을 수 있는 이점이 존재한다.
- [0005] 다만, 타액선 오가노이드를 실제 연구에 적용하는 경우, 타액선의 형태 모사 및 고유의 표지자가 쉽사리 사라지고 발현되지 않는 것을 확인할 수 있다. 이것은 타액선 특유의 복잡한 세포 신호 단계와 더불어 튜브 형태의 기관에서 기인하는 현상으로, 타액선 오가노이드의 성장 및 분화 유도를 위한 효과적인 배양액 및 이를 이용한 효과적인 오가노이드 성숙 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1953978호 (2019.02.25 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 뉴레굴린-1(Neuregulin-1; Nrg1) 및 비타민 A(Vitamin A)를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물을 제공하는데 있다.
- [0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 Nrg1 및 Notch 억제제인 DAPT를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 분화 유도용 배양액 조성물을 제공하는데 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 배양 방법 및 타액선 오가노이드 분화 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Nrg1 및 비타민 A를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 Nrg1 및 Notch 억제제인 DAPT를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 분화 유도용 배양액 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 (1) 타액선 조직으로부터 타액선 줄기세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 타액선 줄기세포

를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계; 및 (3) 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물에 상기 ECM에 접촉된 타액선 줄기세포를 배양하여, 타액선 오가노이드로 성장시키는 단계를 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 배양 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 (1) Nrg1이 포함된 배양액 조성물에 타액선 오가노이드를 배양하는 단계; 및 (2) 상기 타액선 오가노이드 배양액에 Notch 억제제인 DAPT를 첨가하여 추가 배양하는 단계를 포함하는 타액선 오가노이드 분화 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 (1) 타액선 조직으로부터 타액선 줄기세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 타액선 줄기세포를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계; (3) 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물에 상기 ECM에 접촉된 타액선 줄기세포를 배양하여, 타액선 오가노이드로 성장시키는 단계; (4) 상기 성장된 타액선 오가노이드를 Nrg1이 포함된 배양액 조성물에 배양하는 단계; 및 (5) 상기 (4) 단계의 타액선 오가노이드 배양액에 Notch 억제제인 DAPT를 첨가하여 추가 배양하는 단계를 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드의 성장 및 분화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 인간 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드의 성장 및 분화 유도용 배양액 조성물 및 이를 이용한 오가노이드 성숙 방법에 관한 것으로, 상세하게는 인간 타액선 오가노이드의 성장 및 유지에 필수적인 뉴레귤린-1(Neuregulin-1; Nrg1)과 Vitamin A (Retinyl acetate, RA)가 첨가된 배양액 조성을 확립하였고, 이를 통하여 성장된 오가노이드의 분화 유도를 위해 Notch 억제제(DAPT) 등이 첨가된 배양액 조성으로 조직과 유사한 모양의 오가노이드를 시험관 내(in vitro) 3차원 배양을 통해 확립하였으며, 상기 오가노이드는 질환 모델링, 병리연구, 약물스크리닝, 독성평가, 유전자조작에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 IGF-1 성장인자가 포함된 오가노이드 배양액에 배양한 인간 타액선 오가노이드의 현미경 사진을 나타낸다.

도 2는 IGF-1 성장인자가 포함된 오가노이드 배양액에 배양한 인간 타액선 오가노이드의 마커 발현 확인 결과를 나타낸다.

도 3은 Nrg-1 성장인자가 포함된 오가노이드 배양액에 배양한 인간 타액선 오가노이드의 현미경 사진을 나타낸다.

도 4는 RA가 포함된 오가노이드 성장 배양액에 배양한 인간 타액선 오가노이드의 유전자 발현 및 현미경 사진을 나타낸다.

도 5는 Nrg-1 성장인자가 포함된 오가노이드 성장 배양액에 배양한 인간 타액선 오가노이드의 염색 결과를 나타낸다.

도 6은 Nrg-1과 DAPT가 들어간 오가노이드 분화 배양액으로 배양한 인간 타액선 오가노이드의 현미경 사진을 나타낸다.

도 7은 Nrg-1과 DAPT를 포함시킨 분화 배양액에 배양한 인간 타액선 오가노이드의 현미경 사진과 염색 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 Nrg1 및 비타민 A를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 Nrg1 및 Notch 억제제인 DAPT를 유효성분으로 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 분화 유도용 배양액 조성물을 제공한다.

[0019] 바람직하게는, 상기 배양액 조성물은 최종 농도 7.5 내지 150 ng/mL의 Nrg1을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 바람직하게는, 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물은 표 1에 기재된

구성성분으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0021] 바람직하게는, 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 분화 유도용 배양액 조성물은 표 2에 기재된 구성 성분으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 명세서에 있어서, "비타민 A(Vitamin A)"는 "레티닐 아세테이트(RetinyI acetate; RA)"와 동의어로 기재되었다.
- [0023] 한편, 본 발명에서와 같이, 세포를 증식 배지 (gland expansion medium)에서 배양하는 것은 그들의 줄기세포 또는 전구 세포의 성질을 유지시키며, 증식시킬 수 있다. 이 경우 오가노이드는 줄기세포 또는 전구세포로 구성된다. 따라서, 증식 배지에서 키우는 것은 증대된 양의 줄기세포 또는 전구세포, 그리고 이러한 세포들을 포함하고 있는 오가노이드를 얻을 수 있는 이점이 존재한다.
- [0024] 본 발명의 뉴레굴린-1(Neuregulin-1; Nrg1)은 내재적 Wnt 분비 작용제로서, 내재적 Wnt 분비 경로는 타액선 상피성 줄기세포에서 ErbB2와 ErbB3의 이형이량체화(hetero-dimerization) 하류(down stream)의 활성화로 일어난다.
- [0025] 또한, 본 발명의 배양액 조성물에는 Wnt 작용제(e.g. R-spondin), TGF-beta 억제제(e.g. A83-01), cAMP 경로 활성화제(e.g. VIP, Forskolin, Prostaglandin E2), BMP 저해제(e.g. Noggin, Gremlin 1) 또는 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF) 등이 추가될 수 있다.
- [0026] 상기에서, Wnt 작용제는 Wnt 경로를 활성화시킬 수 있는 어떤 작용제라도 사용할 수 있다. 예를 들어, Lgr4, 5, 6의 작용제인 R-spondin 1, 2, 3, 4 중 하나를 포함할 수 있다. R-spondin 1의 경우, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL의 농도가 선호되고, R-spondin 3의 경우, 25, 50, 100, 250, 500 ng/mL의 농도가 선호된다.
- [0027] 상기에서, TGF-beta 억제제는 인간 오가노이드 형성 효율을 증가시키기 때문에 배지에 첨가되는 것이 유리하다. TGF-beta 신호는 세포 성장, 세포 운명 및 세포자살을 포함한 많은 세포 기능에 관여한다. 신호 전달은 전형적으로 TGF-beta 수퍼 패밀리를 가진 제1형 수용체에 결합하는 것으로 시작된다. 그런 다음 제1형 수용체는 SMAD를 인산화하여 핵에서 전사 인자로 작용하고 표적 유전자 발현을 조절한다. 예를 들어, A83-01의 경우, 50, 500, 1000, 2000, 5000 nM의 농도가 선호된다.
- [0028] 상기에서, BMP 저해제는 BMP 분자에 달라붙어 BMP 활성을 억제하거나, BMP 수용체에 달라붙어 BMP와의 결합을 방해하는 것을 의미한다. BMP 억제제로의 예로는 Noggin과 Gremlin이 있다. 이러한 확산성 단백질들은 BMP 기질에 달라붙어 그들의 수용체로의 결합을 억제한다. 이러한 BMP 저해제의 첨가는 줄기세포를 유지하는데 도움을 준다. 선호하는 BMP 저해제는 Noggin이며, Noggin은 증식 배지에 10, 25, 50, 100 ng/mL로 첨가되었다. 선호되는 농도는 100 ng/mL이다.
- [0029] 상기에서, FGF는 FGF 수용체 1 및 FGF 수용체 2에 작용할 수 있는 것을 선택할 수 있으며, 주로, FGF1, FGF2, FGF7, FGF10을 사용하였다. FGF1의 경우, 20, 40, 100 ng/mL의 농도가, FGF2의 경우 5, 20, 40, 100 ng/mL의 농도가, FGF7의 경우, 20, 40, 100 ng/mL의 농도가, FGF10의 경우, 10, 20, 40, 100 ng/mL의 농도가 선호된다. 때로 250, 500 ng/mL의 농도도 사용될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 (1) 타액선 조직으로부터 타액선 줄기세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 타액선 줄기세포를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계; 및 (3) 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물에 상기 ECM에 접촉된 타액선 줄기세포를 배양하여, 타액선 오가노이드로 성장시키는 단계를 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 배양 방법을 제공한다.
- [0031] 바람직하게는, 상기 배양된 타액선 오가노이드는 도관(Ductal) 마커인 CK5 및 CK7, 선방 세포(acinar cell) 마커인 SLC12A2 및 AQP5, 근상피세포(myoepithelial cell) 마커인 ACTA2와, Ki67 및 LGR5가 발현될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 또한, 본 발명은 (1) Nrg1이 포함된 배양액 조성물에 타액선 오가노이드를 배양하는 단계; 및 (2) 상기 타액선 오가노이드 배양액에 Notch 억제제인 DAPT를 첨가하여 추가 배양하는 단계를 포함하는 타액선 오가노이드 분화 방법을 제공한다.
- [0033] 또한, 본 발명은 (1) 타액선 조직으로부터 타액선 줄기세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 타액선 줄기세포를 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)에 접촉시키는 단계; (3) 상기 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드 성장 또는 유지용 배양액 조성물에 상기 ECM에 접촉된 타액선 줄기세포를 배양하여, 타액선 오가노

이드로 성장시키는 단계; (4) 상기 성장된 타액선 오가노이드를 Nrg1이 포함된 배양액 조성물에 배양하는 단계; 및 (5) 상기 (4) 단계의 타액선 오가노이드 배양액에 Notch 억제제인 DAPT를 첨가하여 추가 배양하는 단계를 포함하는 타액선 줄기세포 유래 타액선 오가노이드의 성장 및 분화 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명에 있어서, 타액선 줄기세포를 배양하는 방법은 세포 외 매트릭스(Extracellular matrix; ECM)와 접촉시켜 타액선 줄기세포를 배양하는 것을 포함한다. 임의의 적합한 세포 외 매트릭스가 사용될 수 있다. 분리된 타액선 줄기세포는 바람직하게는 상기 타액선 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, 타액선 줄기세포는 세포 외 매트릭스와 접촉하여 배양된다. "접촉"은 물리적 또는 기계적 또는 화학적 접촉을 의미하며, 이는 상기 생성된 타액선 오가노이드 또는 타액선 줄기세포 집단을 상기 세포 외 매트릭스로부터 분리하기 위해 힘이 사용될 필요가 있음을 의미한다. 바람직하게는, 타액선 줄기세포는 ECM에 매립된다. 본 발명의 배양액은 세포 외 매트릭스로 확산 될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0036] "타액(saliva)"은 이하선, 악하선, 설하선 및 구강점막에 존재하는 점액선 등으로부터 분비되는 혼합액이다. 타액은 인체의 핵심 성분으로 타액선에서 생성되어 구강 내로 배출된다. 타액은 인체의 필수 성분으로서, 생체 활성단백질, 소화효소, 점액, 면역글로불린, 각종 염류 등이 포함되어 있다.

[0037] 타액은 구강 내 건강뿐만 아니라 인체의 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 수행한다. 예를 들어 타액의 주요 성분인 뮤신(mucin), 면역글로불린 등은 외부의 감염으로부터 1차적인 방어 역할을 수행하며, 구강 및 치아의 윤활 및 수분 유지, pH 중화 기능을 통하여 구강점막 및 치아를 보호한다. 뿐만 아니라 타액에는 프티알린(ptyalin) 등의 아밀라아제(amylase)와 같은 소화 효소들이 있어 전분을 말토오스 단위까지 분해하는 등 소화를 촉진시키는 기능을 담당한다. 또한 타액의 분비에 의하여 인체의 수분대사 및 체온 조절이 이루어질 수 있으며, 유독물(I, Hg, Pb 등)을 배설하기도 한다.

[0038] "타액선(침샘, salivary gland)"은 타액을 생성, 분비하는 기관으로 이하선(귀밑샘, parotid gland), 악하선(턱밑샘, submaxillary gland), 설하선(혀밑샘, sublingual gland)과 같은 주타액선(major salivary gland)과, 점액선(mucous gland)과 같이 구강점막(mucous membrane of oral cavity)에 존재하는 점액선(mucous gland)과 같이 구강점막의 여러 부위에 분포하는 소타액선(minor salivary gland)으로 분류된다.

[0039] 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 성장 및 분화 인자의 최적화 연구와 함께 주목을 받고 있다.

[0040] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0041] <실험예>

[0042] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0043] 1. 시약

[0044] 본 발명에 다음의 시약들이 사용되었다.

[0045] 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), Advanced DMEM/F12 (# 12634010, Gibco), Primocin (# anti-pm, Invivogen), HEPES (# 15630-080, Gibco), GlutaMAX (# 35050-061, Gibco), B27 (# 17504-044, Gibco), B27, minus vitamin A (# 12587-010, Gibco), NAC (N-acetyl-cysteine; # A9165, Sigma), Nicotinamide (# N0636, Sigma), A83-01 (# 2939, Tocris), Noggin (# 6057-NG, R&D), Nrg1 (Neuregulin-1; #

100-03, Peprotech), FGF2 (# 100-18B, Peprotech), FGF7 (# 100-19, Peprotech), FGF10 (# 100-26, Peprotech), RSP01 (R-spondin 1, #120-38, Peprotech), Afamin/Wnt3a (# J-ORMW301R, MBL), TrypLE express (# 12605-010, Life technologies), CellBanker 1 (Zenoaq).

2. 인간 타액선 줄기세포 유래 오가노이드 제작

- (1) 인간 타액선 샘플을 채취한 후, 이를 보존액 (1% BSA가 첨가된 $1 \times$ HBSS)에 넣어 당일 또는 다음날 실험 진행 전까지 4°C 냉장고에 보관한다.
- (2) 타액선 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 총 20 ml 만든 후, 37°C 교반 배양기에 200 rpm으로 30 분간 보관한다.
- (3) 반응시킨 타액선 샘플을 70 μm 여과기(strainer)로 걸러서 용해되지 않은 조직을 제거한 후, 걸러진 용액을 300 g에 5 분간 원심분리하여 세포만을 얻는다.
- (4) 세포수를 센 후, 48 웰 플레이트 기준 1.0×10^4 cells이 들어가도록 세포수를 계산하여 다시 한 번 같은 조건으로 원심분리를 시행한다.
- (5) 미리 1시간 이상 37°C 에서 가열된 48 웰 플레이트를 꺼내서 한 웰 당 20 μl 의 BME 2 매트릭스(matrix)를 세포 펠렛과 잘 섞은 후 각 웰에 분주하여 돔(dome) 형태를 만든다. 그 후 37°C 에 20분간 보관한 후, 배지를 250 μl 각 웰에 넣어주어 배양한다.
- (6) 이 때, 배양액 조성은 표 1과 같다.
- (7) 배양 중에 2-3일 간격으로 기존의 배양액을 제거한 후, 새 배양액으로 교체해준다.
- (8) 2주가 지나면 계대 배양(subculture)을 수행한다.

표 1

성장 배양액	최종 농도
Advanced DMEM/F12	
Primocin (500 \times)	1 \times
HEPES (100 \times)	1 \times
Glutamax (100 \times)	1 \times
B27 (50 \times) plus vitamin A	1 \times
NAC	1 mM
Nicotinamide	10 mM
A83-01	0.5 μM
Afamin/Wnt3a	1%
Rspo1	100 ng/ml
Noggin	100 ng/ml
Nrg1	50 ng/ml
FGF7	20 ng/ml
FGF2	20 ng/ml
Y-27632	5 μM

** Afamin/Wnt3a 은 배양 후 첫 3일 동안만 배양액 조성에 첨가해준다.

** B27 plus vitamin A에는 300 nM의 retinyl acetate가 포함되어 있다.

3. 인간 타액선 줄기세포 유래 오가노이드의 분화

- (1) 상기의 방법대로 계대 후 10일 배양한 오가노이드에서 표 2와 같은 배양액 조성으로 배양액을 교체해 준다.
- (2) 2-3일 간격으로 배양액을 교체해 주고, 5일이 지난 후에 배양액에 DAPT (Notch inhibitor, 10 μM)을 처리하여 2일을 더 배양한다.
- (3) 오가노이드 샘플을 수확하여 실험에 사용한다.

표 2

분화 배양액	최종 농도
Advanced DMEM/F12	
Primocin	1 ×
HEPES	1 ×
Glutamax	1 ×
B27 (without vitamin A)	1 ×
NAC	1 mM
A83-01	0.5 μM
Rspo1	100 ng/ml
Nrg1	50 ng/ml
FGF7	20 ng/ml
FGF2	20 ng/ml
FGF10	50 ng/ml
DAPT**	10 μM

[0063] ** DAPT는 마지막 2-3일 동안만 배양액에 첨가해준다.

[0064] 4. 인간 타액선 줄기세포 유래 오가노이드의 계대

[0065] (1) 배양액을 제거한 후, 48 웰 플레이트 1 웰 당 500 ul의 TrypLE Express (10 mM의 Y-27632 첨가)를 넣어주어 피펫팅(pipetting) 한 후, 37℃ 수조에 10분간 반응시킨다.

[0066] (2) 1 ml의 Advanced DMEM/F12를 넣어 준 후 피펫팅(pipetting)을 세게 20회 이상 시행한 후, 300 g로 5분간 원심분리한다.

[0067] (3) 세포 펠렛을 40 μm 여과기(strainer)로 걸러내어 분리되지 않은 오가노이드를 걸러내서 제거한다.

[0068] (4) 걸러진 세포 부유물은 세포수를 세어서 상기 오가노이드 제작 방법을 반복한다.

[0069] <실시예>

[0070] 지금까지 인간 조직 유래 오가노이드에서 잘 알려져 있는 배양 조건을 활용하여 인간 타액선 오가노이드 배양액에 적용해 보았다. 그 중에서, 인간 장 조직 오가노이드 배양액에 사용된 성장인자인 IGF-1이 들어간 배양액을 활용하여 오가노이드 배양을 시도해 보았다. 인간 타액선 오가노이드를 매트릭셀(Matrigel)에 심은 상태로 2주간 IGF-1 성장인자가 포함된 배양액에 배양했을 때에 오가노이드의 성장이 잘 유지되는 것을 현미경 사진상에서 확인하였다(도 1, 좌). 그러나, H&E 염색으로 오가노이드를 이루는 세포의 종류를 확인하였을 때, 오가노이드 안쪽에서 세포질이 염색되지 않는 투명한 세포 형태(clear cell type)가 관찰되었다(도 1, 우).

[0071] 이는, 편평세포 화생(squamous cell metaplasia)의 대표적인 표현형 중 하나로, 정상 타액선 조직에서는 관찰되지 않으므로 조직의 성질을 대변하는 오가노이드의 특성을 잘 반영하지 않았다고 해석하였다. 이와 일치하게, 타액선 조직에서 발견하는 여러 가지 마커 유전자의 발현을 면역염색 기법으로 오가노이드 내에서 확인하였을 때, 선방 세포(acinar cell) 마커인 AQP5, 내강 세포(luminal cell) 마커인 CK7 및 근상피세포(myoepithelial cell) 마커인 ACTA2가 잘 발현되지 않고, 기저 세포에서 발현하는 CK5가 주로 발현하는 점으로 보아, 기저 세포가 주로 분포하는 오가노이드가 형성되었음을 확인하였다. 또한, SLC12A2, CNN1의 발현이 안쪽에서 관찰되는 것으로 편평세포(squamous cell)로의 화생(metaplasia)이 오가노이드 내부에서 일어났음을 확인하였다(도 2). Ki67로 분열하는 세포를 확인하였을 때, 오가노이드 바깥쪽에서 주로 성장이 이루어지고 있음을 확인하였고, 이러한 세포들 주위에서 LGR5가 발현하는 것으로 보아, 오가노이드의 성장에서 WNT 경로가 중요하게 작용함을 확인할 수 있다.

[0072] 정상 타액선 조직의 성질을 오가노이드에서 잘 구현하지 못하는 문제를 보완하기 위해, 기존의 오가노이드 배양액에 사용하는 여러 가지 다른 인자들에 대한 스크리닝을 진행하였고, 그 중에서 뉴레귤린-1(Neuregulin-1; Nrg1)을 EGF와 IGF-1 대신 배양액에 첨가하였다. 그 결과, 기존의 조건과 비교하였을 때 비슷한 정도의 성장을 보이는 오가노이드 배양 조건에서(도 3, 좌), 일부의 오가노이드에서 타액선의 분화와 관련된 표현 형질인 Cleft 형성이 관찰되었다(도 3, 우).

[0073] 위의 조건에서 retinyl acetate(RA)에 따른 유전자 발현 정도를 비교 분석하였을 때, RA에 따라 luminal cell

marker인 *Krt7*이 증가하는 것으로 확인되었지만, acinar cell marker인 *Aqp5*은 감소시키는 것으로 확인되어 RA가 분화를 오히려 억제하는 것을 확인하였다(도 4, 좌). 뿐만 아니라, RA의 유무에 따른 오가노이드의 성장 정도를 확인하였을 때, RA가 배양액에 추가되었을 때 오가노이드의 성장이 훨씬 증진된 것으로 확인되어(도 4, 우) RA는 성장 배양액에는 추가하는 것으로, 분화 배양액에는 제외하는 것으로 조건을 정하였다.

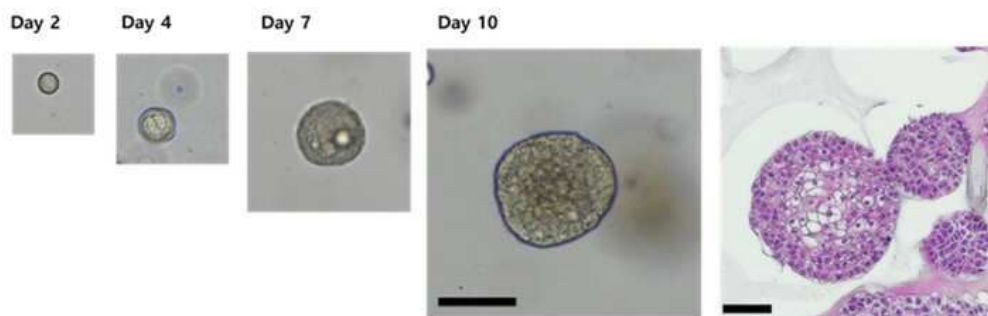
[0074] H&E 염색 기법으로 염색한 결과, 작은 내강(lumen)이 관찰되었고, 여러 가지 유전자의 발현을 살펴보았을 때, 도관(Ductal) 마커인 CK5, CK7, 선방 세포(acinar cell) 마커인 NKCC1, AQP5, 근상피세포(myoepithelial cell) 마커인 ACTA2가 발현하는 것으로 확인되었다(도 5). Ki67 발현을 통해서 해당 오가노이드가 활발히 성장하고 있음을 확인하였고, LGR5 발현을 통해서 오가노이드에서 WNT 경로가 작동됨을 확인하였다. 하지만, 선방 세포(acinar cell)의 분화 마커인 MIST1은 발현되지 않는 것으로 보아, 해당 오가노이드는 최종 분화까지는 진행되지 않은 상태의 오가노이드임을 확인할 수 있다.

[0075] 분화 배양액 조성을 정하기 위해 지금까지 다른 장기의 선행 연구에서 오가노이드의 분화에 관련된 여러 가지 조성물을 대상으로 타액선 오가노이드 분화에 어떠한 영향을 주는지를 확인해 보았다. 그 결과, Notch inhibitor인 DAPT가 들어간 배양액에서 타액선 조직에서 나타나는 특성 중 하나인 budding과 cleft formation이 나타나는 것을 확인하였다(도 6). 시도해 본 조건 중 DAPT와 Rspo1이 들어간 배양액에서 제일 높은 오가노이드 수득률과 분화 특성이 보였으므로 위 두가지가 포함된 배양액을 분화 배양액 조성으로 정하여 추가 실험을 수행하였다.

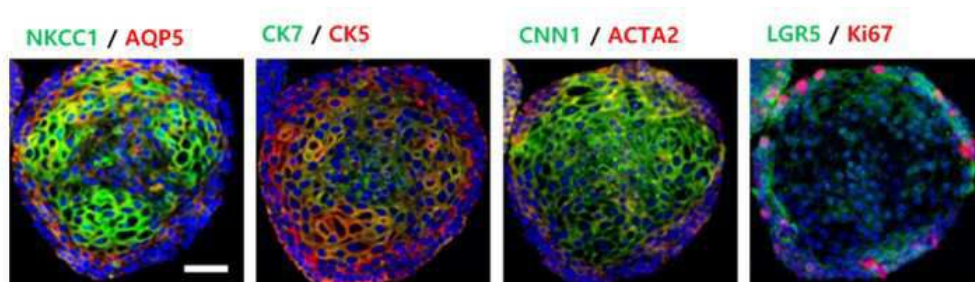
[0076] 따라서 상기에 기재한 대로 인간 타액선 오가노이드를 1주일간 분화시킨 후, 모양과 유전자 발현을 확인하였을 때, 선포(acinus)가 형성이 되면서 분기(branching)가 되는 것을 현미경 상에서 확인하였고, H&E 염색 결과 내강(lumen)이 커져 있고 여러 종류의 세포로 구성되었음을 확인하였다(도 7). 또한, IF 염색으로 선방 세포(acinar cell) 마커인 AQP5와 근상피세포(myoepithelial cell) 마커인 ACTA2를 확인하였을 때, 기존의 조직에서 관찰되는 형태대로 AQP5는 내강(lumen) 근처에서 발현이 되고, ACTA2는 바깥쪽에서 발현되는 것을 확인하였다. 이를 통하여 기존의 성장 배양 조건에서의 발현보다 분화 후 마커 발현이 좀 더 조직의 그것과 비슷함을 확인하였다.

도면

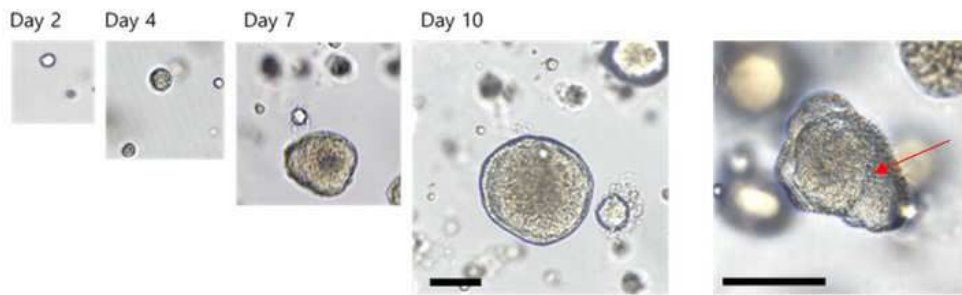
도면1



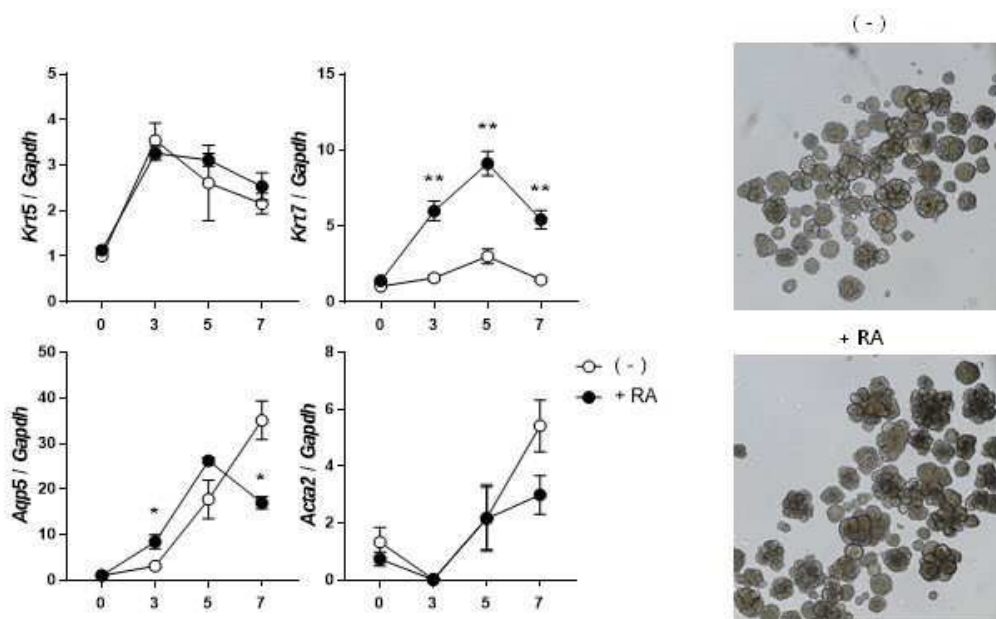
도면2



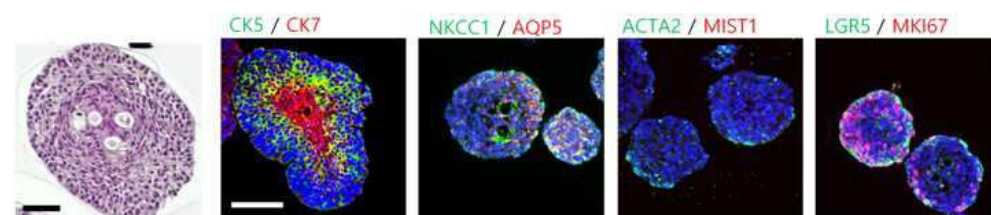
도면3



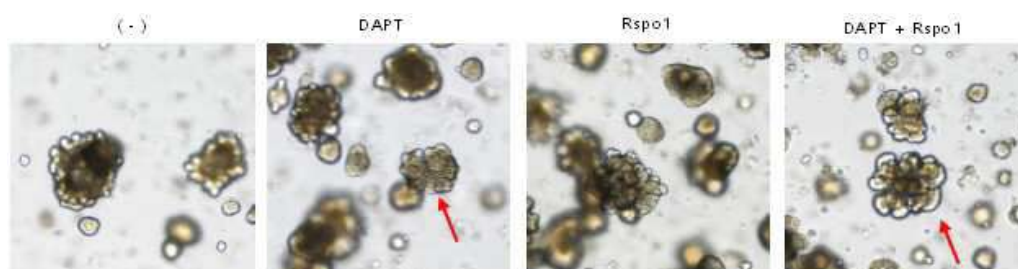
도면4



도면5



도면6



도면7

