

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0143830
(43) 공개일자 2019년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 5/0081 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0074063
(22) 출원일자 2019년06월21일
심사청구일자 2019년06월21일
(30) 우선권주장
1020180071562 2018년06월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
조승우
서울특별시 서초구 서초대로65길 13-10, 106동 2304호 (서초동, 서초래미안아파트)
조안나
서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 525호 (신촌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

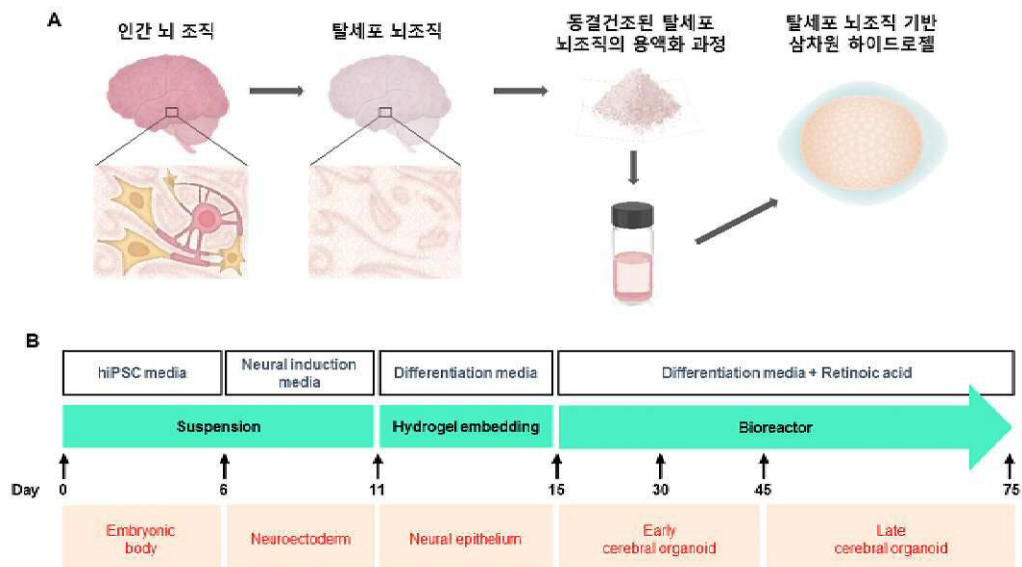
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 탈세포화된 뇌조직 매트릭스 기반 뇌 오가노이드 배양용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법에 관한 것으로, (a) 뇌조직을 탈세포화하는 단계; (b) 상기 뇌조직을 건조하는 단계; 및 (c) 상기 뇌조직을 겔화(gelation)하는 단계;를 포함하는 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2533/54 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

(72) 발명자

이정승

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 525호
(신촌동)

진윤희

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 525호
(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B3005994

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

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

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.09.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A5A1004694

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 단백질기능제어이행연구센터

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 분리된 뇌조직을 탈세포화하는 단계;
- (b) 상기 뇌조직을 건조하는 단계; 및
- (c) 상기 뇌조직을 겔화(gelation)하는 단계;를 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 상기 뇌조직 및 매트릭젤(matrigel)을 혼합하여 하이드로겔을 수득하는 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 하이드로겔은 뇌조직 유래 세포외기질(decellularized brain extracellular matrix; dBEM)을 0.01 내지 2.0 mg/mL 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 뇌조직을 탈세포화 용액에서 교반시키는 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 뇌조직을 3 내지 24시간 동안 교반시키는 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 탈세포화에 의해 상기 뇌조직 세포가 95% 이상 제거된 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법.

청구항 7

탈세포 뇌조직 유래 세포외기질(decellularized brain extracellular matrix; dBEM)을 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 하이드로겔 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

매트릭젤(matrigel)을 더 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 하이드로겔 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 뇌조직 유래 세포외기질(dBEM)의 농도는 0.01 내지 2.0 mg/mL인 뇌 오가노이드 배양용 하이드로겔 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

1Hz 기준 탄성계수가 100 내지 150Pa인 뇌 오가노이드 배양용 하이드로겔 조성물.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물에서 뇌 오가노이드를 배양하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탈세포화된 뇌조직 매트릭스를 이용한 뇌 오가노이드 배양용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직 및 기관의 탈세포화는 세포 배양 및 이식을 위한 기능성 지지체 또는 스캐폴드(scaffold)를 제조하기 위한 유망한 방안으로써 연구되고 있다.

[0003] 탈세포화 과정에서, 조직으로부터 세포 성분들이 제거되지만, 세포외기질 및 일부 성장인자 단백질들은 보존된다.

[0004] 따라서, 탈세포화 조직 내 보존된 콜라겐, 파이브로넥틴(fibronectin) 및 라미닌(laminin)을 포함하는 다양한 세포외기질 성분들은 온전한 조직 내와 유사한 삼차원적인 미세환경을 제공함으로써 배양된 세포의 생존, 증식 및 분화를 향상시킬 수 있다.

[0005] 추가적으로, 세포 성분의 제거는 탈세포화 매트릭스를 세포 이식에 대한 최소한의 면역원성을 가진 기능성 지지체로 변화시킨다.

[0006] 최근 뇌, 심장, 혈관, 심장판막, 폐, 및 신장에서 유래된 여러 가지 형태의 탈세포화 기관을 응용한 기능성 조직공학 지지체에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0007] 특히, 뇌는 생물체를 조절하는 주요 관제탑 역할을 하는 장기로서 신경세포들과 그 외 여러 세포들 간의 긴밀한 네트워크를 통해 기능을 하는 중요한 기관이지만 복잡한 구조 및 작동원리로 인해 충분한 연구가 진행되지 못하고 있으며, 뇌신경 질환의 발병원인 및 신약 개발 연구에 있어 한계에 직면하고 있다.

[0008] 따라서, 뇌 조직 및 기능을 구현하는 체외모델 시스템 구축을 통한 활발한 뇌신경 연구의 필요성이 점차 대두되고 있으며, 인간 줄기세포 유래의 오가노이드를 이용하여 미니 장기들을 제작하는 새로운 연구가 각광받고 있다.

[0009] 그럼에도 불구하고, 현재 오가노이드 배양 기술로 제작된 뇌 오가노이드는 분화도 및 기능적인 측면에서 실제 뇌조직과 많은 차이를 가지고 있어 더욱 성숙한 뇌 오가노이드 배양을 위한 요소 기술 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0074672호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 현재 배양 기술에 따른 뇌 오가노이드의 미성숙한 구조 발달 및 미성숙한 분화를 개선하고 실제 뇌와 유사한 뇌 오가노이드를 제작을 위한 삼차원 배양 플랫폼을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 뇌조직을 탈세포화하는 단계; (b) 상기 뇌조직을 건조하는 단계; 및 (c) 상기 뇌조직을 겔화(gelation)하는 단계;를 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법이 제공된다.
- [0013] 일 실시예에 있어서, 상기 (c) 단계에서 상기 뇌조직 및 매트릭겔(matrigel)을 혼합하여 하이드로겔을 수득할 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 뇌조직 유래 세포외기질(decellularized brain extracellular matrix; dBEM)을 0.01 내지 2.0 mg/mL 포함할 수 있다.
- [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 (a) 단계에서 상기 뇌조직을 탈세포화 용액에서 교반시킬 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 뇌조직을 3 내지 24시간 동안 교반시킬 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 탈세포화에 의해 상기 뇌조직 세포가 95% 이상 제거될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 탈세포 뇌조직 유래 세포외기질(decellularized brain extracellular matrix; dBEM)을 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 하이드로겔 조성물이 제공된다.
- [0019] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 매트릭겔(matrigel)을 더 포함할 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 있어서, 상기 뇌조직 유래 세포외기질(dBEM)의 농도는 0.01 내지 2.0 mg/mL일 수 있다.
- [0021] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물의 1Hz 기준 탄성계수가 100 내지 150Pa일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물에서 뇌 오가노이드를 배양하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명은 종래 뇌 오가노이드 배양 기술과 달리 실제 뇌조직을 구현하는 체외 모델로서의 적용 가능성이 높다.
- [0024] 본 발명의 뇌조직 매트릭스 기반 하이드로겔은 뇌 오가노이드의 신경세포 분화 및 피질층 신경세포로의 분화를 촉진할 수 있으며 유사 뇌조직 형태의 체외 모델 구축에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 탈세포 뇌조직 기반 삼차원 하이드로겔을 이용한 뇌 오가노이드 제작 방법을 도식화한 것이다.
- 도 2는 인간 탈세포화 뇌조직을 제작하고 분석한 결과이다.
- 도 3은 탈세포 뇌조직의 성분을 분석한 결과이다.
- 도 4는 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔의 기계적 물성을 분석한 결과이다.
- 도 5는 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔의 조직 특이적인 효과를 분석한 결과이다.
- 도 6은 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔 또는 매트릭겔을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 신경 분화를 비교 분석한 결과이다.
- 도 7 내지 9는 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔 또는 매트릭겔을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 신경 분화, 구조 성숙 및 발달 정도를 확인한 것이다.
- 도 10은 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔 또는 매트릭겔을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 기능성을 비교 분석한 결과이다.
- 도 11은 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔 또는 매트릭겔을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 분화 및 세포간 네트워크를 비교 분석한 결과이다.
- 도 12는 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔 또는 매트릭겔을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 피질층 발달을 비교 분석한 결과이다.

도 13은 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔 또는 매트릭스를 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 퍼질층 및 전뇌 발달을 비교 분석한 결과이다.

도 14는 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 유전자 발현을 qPCR 분석한 결과이다.

도 15 내지 17은 탈세포 뇌조직 기반 하이드로겔을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 유전자 발현을 gene ontology(GO) 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0029] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0030] 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.
- [0031] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 뇌조직을 탈세포화하는 단계; (b) 상기 뇌조직을 건조하는 단계; 및 (c) 상기 뇌조직을 겔화(gelation)하는 단계;를 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 조성물 제조방법이 제공된다.
- [0032] 상기 조성물은 탈세포화하여 수득한 뇌조직 매트릭스 조성물을 기반으로 제조한 3차원 배양 하이드로겔을 포함하며, 뇌 오가노이드 배양에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0033] 상기 탈세포화된 뇌조직은 실제 조직 특이적 세포외기질 성분을 포함하므로 해당 조직의 물리적, 기계적, 생화학적 환경을 제공할 수 있으며, 뇌조직 세포로의 분화 및 조직 특이적 기능성을 증진시키는데 매우 효율적이다.
- [0034] 상기 “오가노이드(organoid)”는 조직 또는 전분화능줄기세포에서 유래된 세포를 3D 형태로 배양하여 인공장기와 같은 형태로 제작한 초소형 생체기관을 의미한다.
- [0035] 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) 패턴링에 의해 특정 조직으로 발달할 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 상기 (b) 단계에서 세포외기질을 포함하는 탈세포 뇌조직은 공기 건조 또는 동결 건조될 수 있다. 상기 탈세포 뇌조직은 건조 후 전자 빔 또는 감마 방사선에 의해 에틸렌 옥사이드 가스 또는 초임계 이산화탄소에 노출되어 최종 멸균될 수 있다. 상기 탈세포 뇌조직은 동결 건조된 상태로 저장되고, 포장되거나 분산될 수 있다.
- [0038] 상기 멸균된 탈세포 뇌조직은 산성 용액에서 펩신 또는 트립신과 같은 단백질 분해 효소로 용액화될 수 있고, 중화를 위해 예컨대 등장성 완충액(isotonic buffer) 또는 NaOH 등의 염기와 혼합하여 pH 7.2 내지 7.8로 조정될 수 있으며, 25 내지 38℃의 온도에서 겔화(gelation)될 수 있다.
- [0039] 상기 (c) 단계에서 상기 뇌조직 및 매트릭셀(matrigel)을 혼합하여 하이드로겔을 수득할 수 있다.
- [0040] 상기 “매트릭셀(matrigel)”은 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스의 육종세포에서 추출된 단백질 복합체로서

(BD Bioscience社의 제품명), 라미닌(laminin), 콜라겐(collagen), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan)과 같은 세포외 매트릭스와 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor; FGF), 상피 세포 성장인자(epidermal growth factor; EGF), 인슐린 성장인자(insulin-like growth factor; IGF), 형질전환 성장인자-베타(transforming growth factor-beta; TGF- β 또는 혈소판 유래 성장인자(platelet-derived growth factor; PDGF)를 포함할 수 있다.

- [0041] 상기 “하이드로겔”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.
- [0042] 상기 하이드로겔은 상기 탈세포화된 뇌조직과 상기 매트릭스를 소정의 비율로 포함할 수 있고, 상기 하이드로겔은 뇌조직 유래 세포외기질(decellularized brain extracellular matrix; dBEM)을 0.01 내지 2.0 mg/mL 포함할 수 있다.
- [0043] 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.
- [0044] 상기 세포외기질은 콜라겐, 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸, 항균제(antimicrobials), 화학유인물질(chemoattractants), 시토카인(cytokines), 및 성장 인자에 제한되지 않는, 구조형 및 비구조형 생체 분자(biomolecules)의 혼합물일 수 있다.
- [0045] 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 있으며, 상기 탈세포화된 뇌조직을 적정 비율로 혼합함으로써 뇌조직 유래 세포외기질을 0.01 내지 2.0 mg/mL 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.
- [0047] 예컨대, 세포외기질-유래 겔은 세포외기질을 분리하기 위해 기술적으로 알려진 다양한 방법에 의해 조직으로부터 수득한 세포외기질 성분을 포함하는 겔을 의미한다. 또는, 상기 뇌조직-유래 세포외기질은 유용한 방법에 의해 뇌조직에서 수득한 성분을 포함하는 세포외기질을 의미할 수 있다.
- [0048] 상기 (a) 단계에서 상기 뇌조직을 탈세포화 용액에서 교반시킬 수 있다.
- [0049] 일 실시예에서, 상기 뇌조직을 3 내지 24시간 동안 교반시킬 수 있고, 상기 탈세포화에 의해 상기 뇌조직 세포가 95% 이상 제거될 수 있다.
- [0050] 상기 “탈세포화 용액”은 뇌조직의 세포를 제거하기 위한 다양한 세제 성분을 포함할 수 있고, 예컨대, 고장성 식염수(hypertonic saline), 과산화 아세트산(peracetic acid), 트리톤-X(Triton-X), SDS 또는 기타 세제 성분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 상기 탈세포화된 세포외기질은 건조될 수 있으며, 동결 건조되거나 공기 건조될 수 있다.
- [0052] 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.
- [0053] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 탈세포 뇌조직 유래 세포외기질(decellularized brain extracellular matrix; dBEM)을 포함하는 뇌 오가노이드 배양용 하이드로겔 조성물이 제공된다.
- [0054] 상기 하이드로겔 조성물은 상기 탈세포 뇌조직 유래 세포외기질을 적정 비율로 포함하므로, 탄성계수가 실제 뇌 조직 환경과 유사한 수준으로 유지될 수 있으며, 1Hz 기준 탄성계수 100 내지 150Pa에서 최적의 뇌 오가노이드 배양 환경이 조성될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물에서 뇌 오가노이드를 배양하는 방법이 제공된다.
- [0056] 기존의 매트릭스 기반 배양 시스템은 동물 암조직 유래의 추출물로서 배치 간의 차이가 크고 실제 뇌의 환경을 모사해주지 못하고, 뇌 오가노이드로 분화, 발달되는 효율이 미흡한 반면, 상기 하이드로겔 조성물은 뇌조직 유

사 환경을 조성할 수 있으므로 뇌 오가노이드 배양에 있어서 적합하다.

- [0057] 상기 뇌조직 매트릭스 기반 하이드로겔 조성물에서 배양된 뇌 오가노이드는 전반적인 신경세포 분화 및 피질층 신경세포로의 분화가 촉진될 뿐만 아니라 구조적으로도 실제 뇌와 유사한 형태로 발달될 수 있다.
- [0058] 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.
- [0059] 서로 다른 유형의 세포를 유지, 증식, 확대 및 분화 시키기 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.
- [0060] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0061] **실험예 1 : 탈세포 뇌조직(dBEM) 기반 삼차원 하이드로겔을 이용한 뇌 오가노이드 제작**
- [0062] 도 1을 참조하면, 탈세포화된 뇌조직 유래 세포외기질(dBEM)을 함유하는 하이드로겔을 이용하여 뇌 오가노이드 제작 효율이 우수한 삼차원 배양 플랫폼을 제조하였다.
- [0063] 상기 dBEM은 조직 특이적인 세포외기질 성분을 포함하므로 배양세포에 조직 특이적인 물리적, 생화학적 미세환경을 제공하여 오가노이드의 생성 및 분화 효능을 증진시킬 수 있다.
- [0064] 동결건조된 dBEM은 효소처리방법을 통한 용액화 과정을 거쳐 하이드로겔 제작에 활용되었다(도 1A).
- [0065] 도 1B의 배양 프로토콜을 통해 dBEM 기반 하이드로겔 내에서 뇌 오가노이드를 형성하고 장기간 배양할 수 있다.
- [0066] **실험예 2 : 인간 탈세포화 뇌조직(dBEM) 제작 및 분석**
- [0067] 분리된 인간뇌조직을 1 x 1 x 1 cm³ 크기로 절단하고, 하기 순서로 탈세포화 용액에 교반시켜 탈세포화 하였다.
- [0068] 먼저, 증류수에서 24시간 동안 교반(60 rpm)하고, 0.05%(v/v) 트립신/EDTA(trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에서 90분간 교반(60 rpm, 37°C)하였다.
- [0069] 0.1%(v/v) 수산화암모늄(Sigma, St. Louis, MO)을 포함하는 3%(v/v) Triton X-100(Wako, Osaka, Japan)에서 120분간 교반하였다.
- [0070] 1M 수크로스 용액(Sigma)에서 30분간 교반하고, 증류수에서 15분간 교반하였다.
- [0071] 3%(v/w) 황산 도데실 나트륨(Sigma)에서 60분간 교반하고, 4%(v/v) 에탄올(Sigma)에서 120분간 교반하였다.
- [0072] PBS(Sigma)에서 15분간 교반하고, 1%(v/v) 페니실린/스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific)에서 60분간 교반(60 rpm)하였다.
- [0073] 마지막으로 증류수에서 15 분간 교반하고, PBS에서 15 분간 교반하였다.
- [0074] 각각의 용액 교체시, 증류수를 이용하여 기존의 용액을 세척하였다. 특별한 언급이 없으면 모든 과정은 4°C에서 수행되었으며 120 rpm에서 교반시켜 탈세포화 하였다.
- [0075] 도 2를 참조하면, 탈세포 과정을 통해 세포는 효율적으로 제거할 수 있고, 매트릭스 조직이 대부분 유지되는 탈세포 뇌조직 유래의 세포외기질(dBEM)이 확보될 수 있다.
- [0076] 조직학(H&E staining, Masson's trichrome staining; MT staining) 분석을 통해 탈세포 과정을 거친 후 조직으로부터 세포가 제거된 반면, 생화학적 미세환경을 모사하는 세포외기질 성분이 유지됨을 확인하였다(도 2A).
- [0077] DNA를 정량한 결과 조직으로부터 대부분의 세포(98% 이상)가 제거되었다(도 2B).
- [0078] GAG(Glycosaminoglycan)을 정량한 결과 탈세포 과정 후 대부분의 GAG 성분이 손실되지 않고 조직 내에 유지되었다(도 2C).
- [0079] **실험예 3 : 하이드로겔 성분 분석**
- [0080] 형광면역염색(immunostaining) 및 질량분석법(mass spectrometry)을 통해 오가노이드 형성에 영향을 줄 수 있는 뇌조직 유래의 세포외기질 성분을 분석하였다.

- [0081] 도 3을 참조하면, 면역염색을 통해 뇌조직(탈세포 전)에 세포의 발달 및 분화에 중요한 요소인 라미닌(laminin)의 아형(subtype)을 분석한 결과, 특히 아형(subtype) $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$ 라미닌이 다량 존재하였다(도 3A).
- [0082] 질량분석법(mass spectrometry)을 이용하여 탈세포 뇌조직 내의 단백질 성분을 분석한 결과 다양한 종류의 콜라겐(collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 라미닌과 같은 당단백질 뿐만 아니라 프로테오글리칸, 지질 성분들도 다량 포함되었다(도 3B).
- [0083] 즉, dBEM 하이드로겔은 뇌조직 특이적 미세환경을 모사하는 생화학적 성분들을 바탕으로 뇌 오가노이드 형성 및 분화를 증진시킬 것으로 평가되었다.
- [0084] **실험예 4 : 기계적 물성 분석**
- [0085] 오가노이드 제작에 널리 활용되고 있는 하이드로겔 종류 중 하나인 매트릭겔(Matrigel)과 상기 실험예 2에서 제작한 dBEM 성분을 혼합하여 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 dBEM 을 포함하는 하이드로겔을 제작하였다.
- [0086] 시판되는 매트릭겔의 특성에 따라 낮은 온도에서는 용액 상태이며, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 겔화가 진행된다. 구체적으로, 동결건조된 dBEM을 용액상태로 녹이고, 용액 상태의 매트릭겔과 혼합 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분 반응시켜 겔화 된 스캐폴드를 형성시켜 dBEM 을 포함하는 하이드로겔을 제작하였다. 이를 dBEM 하이드로겔이라 명명하였다.
- [0087] Rheometer를 이용하여 매트릭겔(Matrigel) 하이드로겔 및 dBEM 하이드로겔의 물리적 특성을 비교 분석한 결과 측정 주파수 내에서 탄성계수(elastic modulus)가 점탄성계수(viscous modulus) 보다 높게 측정되어 안정적인 하이드로겔을 형성하였다.
- [0088] 도 4를 참조하면, 1 Hz 기준 탄성계수를 비교한 결과 매트릭겔은 약 115 Pa, dBEM은 약 126 Pa의 탄성계수로서 dBEM을 첨가에 따른 하이드로겔의 물리적 특성 변화는 크지 않았다.
- [0089] **실험예 5 : 하이드로겔의 조직 특이적인 효과 분석**
- [0090] 도 5를 참조하면, 다양한 조직 유래의 탈세포화 세포외기질을 이용하여 조직 특이적 3차원 하이드로겔을 제작하고 dBEM 하이드로겔의 뇌조직 특이적 기능성을 확인하였다.
- [0091] 인간 유도만능줄기세포(human induced pluripotent stem cell; iPSC) 유래 뇌 오가노이드의 3차원 배양을 실시한 결과, dBEM 하이드로겔에서 배양한 뇌 오가노이드의 크기가 매트릭겔 보다 컸으며(배양 초기, 20일 차), 초반 뇌 오가노이드 형성에 중요한 신경관(neural tube) 형성이 뚜렷하고 세포의 밀집도(density)도 높았다(도 5A).
- [0092] 각 하이드로겔 내에서 배양된 뇌 오가노이드의 크기를 정량한 결과, dBEM 하이드로겔에서 키운 뇌 오가노이드의 크기가 가장 컸으며, 뇌조직 특이적인 dBEM 하이드로겔이 뇌 오가노이드 배양에 효과적인 것으로 분석되었다(도 5B).
- [0093] **실험예 6 : 뇌 오가노이드 신경 분화 확인**
- [0094] 도 6을 참조하면, dBEM 하이드로겔을 이용하여 30일동안 뇌 오가노이드를 배양하고 오가노이드 내부의 분화 및 발달 정도를 분석하였다.
- [0095] 형광면역염색을 통해 신경세포 계통(neuronal lineage)으로의 분화를 분석하였다.
- [0096] dBEM 하이드로겔에서 분화된 오가노이드는 매트릭겔에서 분화된 오가노이드보다 신경줄기세포 마커(Nestin) 및 성숙한 신경세포 마커(Tuj1, MAP2)의 발현이 증가하였다(도 6A 및 6B).
- [0097] 이미지 기반의 분석을 통해 dBEM 하이드로겔에 의해 신경세포의 분화뿐 아니라 신경줄기세포의 증식 및 뇌 오가노이드의 발달 역시 촉진됨을 확인하였다(도 6C 및 6D).
- [0098] 특히 배양환경에 상관없이(spinner flask, multiwell plate) dBEM 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드의 크기가 증가하였다(도 6D).
- [0099] **실험예 7 : 뇌 오가노이드 분화 및 발달 확인**
- [0100] dBEM 하이드로겔을 이용하여 30일동안 뇌 오가노이드를 배양하고 분화 및 발달 정도를 분석하였다.
- [0101] 형광면역염색을 통해 신경세포 마커(Tuj1, NeuN, MAP2), 초기 뇌 발달의 등측(dorsal)을 형성하는 마커(Pax6), 전뇌(forebrain)에 해당하는 마커(FoxG1), 줄기세포 마커(Sox2)의 발현을 분석하였다(도 7).

- [0102] dBEM 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드에서 신경세포로의 분화뿐만 아니라 줄기세포의 생성도 증가하여 뇌 오가노이드 성숙이 촉진되고 크기도 현저히 증가하였다(도 7A).
- [0103] 또한, 조직학 및 SEM 분석을 통해서 뇌 오가노이드 내의 세포 밀집도가 증가하였고(도 7B), 뇌 오가노이드 내 빈 공간이 감소하였으며(도 7C), dBEM 하이드로겔 내에서 성숙한 오가노이드의 형성이 확인되었다.
- [0104] 특히, 인간 뇌의 기저판(basal lamina)에 해당하는 라미닌 층이 dBEM에서 배양된 뇌 오가노이드에서 보다 선명하게 형성되었다(도 7D).
- [0105] dBEM 하이드로겔을 이용하여 45일동안 뇌 오가노이드를 배양하고 이의 분화 및 발달 정도를 분석하였다.
- [0106] 도 8을 참조하면, 피질층(cortical layer) 마커인 TBR1과 TBR2를 염색한 결과 기존의 매트릭셀 배양환경보다 상기 마커들을 발현하는 세포의 수도 증가하였으며, 발현하는 세포층의 두께가 증가하였다(도 8A 및 8B).
- [0107] 또한, 신경세포-신경세포 간의 상호작용(N-cadherin)도 촉진됨을 확인하였다(도 8C).
- [0108] 매트릭셀, dBEM 하이드로겔을 이용하여 45일 동안 뇌 오가노이드를 배양하고 조직 투명화 기술을 이용하여 뇌 오가노이드에서의 3차원 신경세포 분포 및 구조 발달을 확인하였다.
- [0109] 도 9를 참조하면, dBEM 하이드로겔을 이용하여 배양한 뇌 오가노이드에서 성숙한 신경세포로의 분화가 증가하였으며, 뇌 조직 특이적인 주름구조가 실제 뇌와 유사한 형태로 발달하였다.
- [0110] **실험예 8 : 뇌 오가노이드 기능성 분석**
- [0111] 형광 칼슘 이미징 실험을 통해 하이드로겔에서 45일 간 배양한 뇌 오가노이드의 글루탐산(glutamate) 및 감마아미노낙산(GABA) 신경전달물질(neurotransmitter)에 대한 반응성을 확인하였다.
- [0112] 도 10을 참조하면, dBEM 하이드로겔에서 배양한 뇌 오가노이드가 매트릭셀에서 배양한 뇌 오가노이드에 비해 글루탐산에 반응하는 세포의 비율 및 세포 내 유입되는 칼슘의 양이 더 높은 수준이었다(도 10A 및 10D).
- [0113] dBEM에서 배양한 뇌 오가노이드는 감마아미노낙산에도 반응하는 반면, 매트릭셀에서 배양한 뇌 오가노이드에서는 반응하는 세포는 관찰되지 않았다(도 10B).
- [0114] 반면, dBEM 하이드로겔에서 배양한 뇌 오가노이드가 글루탐산에 반응하는 것이 관찰되었으며, sodium channel blocker인 tetrodotoxin(TTX)을 처리 하였을 경우 신경전달신호 및 활성도가 감소하였다(도 10C).
- [0115] 패치클램프를 이용하여 dBEM 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드의 전기 생리학적 기능성을 분석하였다(도 10E 내지 10G).
- [0116] 전압-클램프 상태에서 전압개폐성 나트륨채널에 의한 전류 생성이 확인되었으며(도 10E), Na⁺ channel 차단제인 TTX (Tetrodotoxin) 처리에 나트륨 채널에 의한 전류가 사라졌다(도 10G). 전류-클램프 상태에서 측정하였을 때 활동 전위가 생성되었다(도 10F).
- [0117] 즉, dBEM 조건에서 배양된 뇌 오가노이드가 매트릭셀 조건에서 배양된 뇌 오가노이드와 비교하여 신경 전기생리학적 기능성이 현저히 우수하였다.
- [0118] **실험예 9 : 뇌 오가노이드 분화 및 세포간 네트워크 확인**
- [0119] 형광면역염색을 통해, 대조군인 매트릭셀 및 dBEM 하이드로겔을 이용하여 75일간의 뇌 오가노이드 배양을 진행한 후 분화 및 세포 간 네트워크 형성을 분석하였다.
- [0120] 도 11을 참조하면, dBEM 하이드로겔에서 배양한 뇌 오가노이드에서 신경세포 간 adhesion 역할을 한다고 알려진 N-Cadherin의 발현 및 분포율이 매트릭셀에서 배양한 뇌 오가노이드에 비해 현저히 높은 수준으로 나타났다.
- [0121] 상기 N-cadherin은 신경돌기 발달 촉진 및 시냅스 형성(synaptogenesis)에 관련된 단백질로 알려져 있다(도 11A 및 11B).
- [0122] 형광면역염색을 통해 dBEM 조건에서 배양된 뇌 오가노이드에서 시냅스 소포(synaptic vesicle) 마커인 Synapsin I 단백질의 발현을 분석하였다.
- [0123] Synapsin I은 신경 시냅스의 화학적 신경신호전달 과정에 중요한 단백질이며, 상기 결과는 dBEM을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 성숙도가 높은 수준임을 시사한다(도 11C).

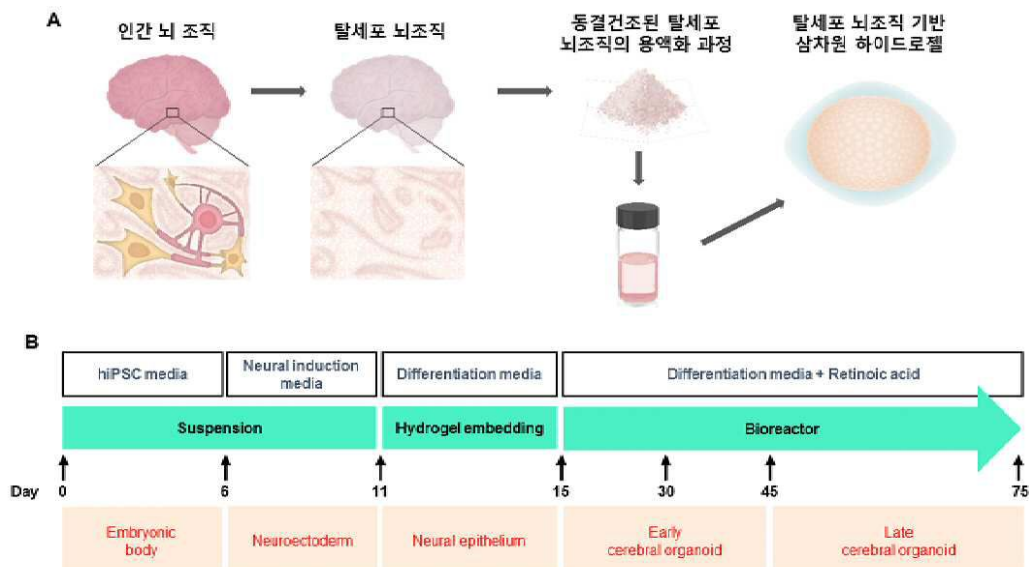
- [0124] 또한, Glutamatergic neuron 대표 마커인 VGLUT의 발현을 통해 dBEM에서 배양된 뇌 오가노이드에서의 높은 분화도를 확인하였다(도 11D).
- [0125] **실험예 10 : 뇌 오가노이드 피질층 발달 분석**
- [0126] 형광면역염색을 통해 75일동안 매트릭셀, dBEM 하이드로겔을 이용하여 뇌 오가노이드를 배양한 후 뇌 오가노이드의 피질층 발달 정도를 분석하였다.
- [0127] 도 12를 참조하면, dBEM 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드에서 피질층 IV 위치에 해당하는 마커인 TBR1의 발현 및 두께가 증가하였으며, 성숙한 뇌 오가노이드로 분화하였음이 확인되었다(도 12A).
- [0128] dBEM 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드에서 뇌실밑구역(subventricular zone)에 해당하는 마커인 TBR2의 발현이 전반적으로 넓게 분포하였으며(도 12B), 뇌 오가노이드의 피질층 및 특이적인 주름 구조도 잘 발달되었다(도 12C).
- [0129] 길이가 가장 긴 부분을 기준으로 형성된 뇌 오가노이드의 크기를 측정하였을 때 매트릭셀보다 dBEM 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드의 크기가 현저히 컸으며(도 12D), dBEM 하이드로겔에서 지속적으로 피층 마커들이 지속적으로 발현하였다(도 12E).
- [0130] 또한, 2차원 및 3차원 광시트 현미경(light-sheet microscopy)을 이용하여 형성된 뇌 오가노이드를 분석한 결과 dBEM 하이드로겔 그룹에서 뇌 오가노이드의 주름 구조가 발달하고, 전체 부피가 증가하였다(도 12F 및 12G).
- [0131] 상기 결과는 dBEM 하이드로겔에 의해 뇌 오가노이드의 성숙 정도가 증가될 수 있음을 시사한다.
- [0132] **실험예 11 : 뇌 오가노이드 피질층 및 전뇌 발달 분석**
- [0133] dBEM 하이드로겔을 이용하여 뇌 오가노이드를 75일 동안 배양하고, 형광면역염색을 통해 피질층의 성숙 및 전뇌 부분의 발달을 분석하였다.
- [0134] 도 13을 참조하면, 뇌실밑구역에 해당하는 마커인 TBR2와 5번 피질층의 마커인 CTIP의 면역염색을 통해 dBEM 환경에서 배양된 뇌 오가노이드 피질층의 성숙 및 발달이 확인되었다(도 13A).
- [0135] 또한, 전뇌 마커인 FoxG1의 전반적인 분포를 비교하였을 때, dBEM 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드에서 전뇌 특이적 마커의 발현량이 현저히 증가하였으며, 크기 및 성숙도 역시 증가하였다(도 13B).
- [0136] **실험예 12 : 뇌 오가노이드 유전자 발현 비교(qPCR)**
- [0137] qPCR을 통해 75일 간 하이드로겔에서 배양된 뇌 오가노이드의 유전자 발현을 확인하고, 대조군으로 인간 태아 유래 신경줄기세포(hNSC; human fetal neural stem cell)와 인간 유래 뇌조직(hTissue; human Tissue)의 유전자 발현량을 함께 비교하였다.
- [0138] 도 14를 참조하면, dBEM을 이용하여 배양된 뇌 오가노이드의 경우, 매트릭셀 내에서 배양된 뇌 오가노이드에 비해 신경세포 마커인 Tuj1와 도파민성 신경세포(dopaminergic neuron) 마커인 TH의 발현이 증가하였으며, 세포 간 부착(adhesion) 및 신경세포 생존에 중요한 역할을 하는 CDH1 발현 역시 증가하였다.
- [0139] **실험예 13 : 뇌 오가노이드 유전자 발현 비교(Gene ontology)**
- [0140] 매트릭셀에서 배양된 뇌 오가노이드 및 dBEM에서 배양된 뇌 오가노이드에 대한 전사체 발현 분석을 통해 양자의 특성을 비교 분석하였다.
- [0141] RNA-sequencing을 통해 gene ontology(GO) category 분석을 기초로 상기 두 그룹간의 유전자 발현 양상을 비교하였다.
- [0142] 매트릭셀 그룹에 비해 dBEM 그룹에서 증가된 유전자(필터링 조건: 1.2 이상 차이, $p < 0.05$, FDR < 0.1 , $n=3$)를 clustering 하여 gene ontology(GO) 분석을 수행하였다.
- [0143] 도 15A를 참조하면, 가장 높은 스코어를 가진 GO term 30개는 대부분이 신경계와 관련되었다.
- [0144] 특히, dBEM에서 배양된 뇌 오가노이드에서 시냅스(synapse)와 neurotransmitter transmission 등 전기생리학적 기능과 관련된 많은 마커 발현이 증가하는 증가하였다. 상기 결과는 개발된 dBEM 에서 배양된 뇌 오가노이드가 기존 매트릭셀 조건으로 배양된 경우보다 효율적으로 유도되었음을 시사한다.
- [0145] 도 15B 내지 15I를 참조하면, 전분화능(pluripotency)과 관련된 유전자들 발현이 증가하였으며, 전뇌

(forebrain) 관련 마커, 성숙한 신경세포 관련 마커의 발현도 함께 증가하였다.

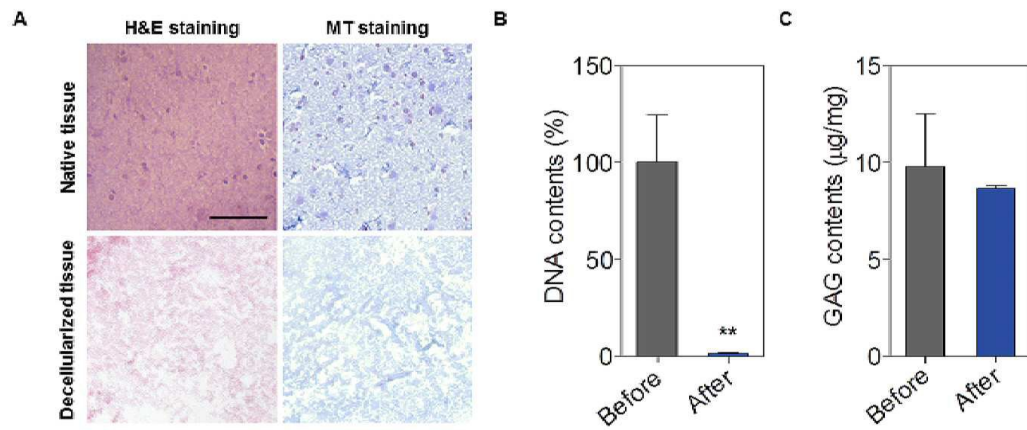
- [0146] 특히, 신경교(glia) 관련 마커는 뇌 오가노이드 배양에 있어 신경 관련 마커 발현 이후 검출되는 것으로 알려져 있다.
- [0147] dBEM 그룹에서 관련 마커들이 증가하였으며, 상기 결과는 dBEM 그룹의 뇌 오가노이드의 성숙도가 촉진됨을 의미한다. 또한, 세포외기질과의 상호작용(ECM interaction)과 세포 부착(cell adhesion)과 관련된 다수의 유전자의 발현이 증가하였다.
- [0148] 도 16 참조하면, Gene ontology(GO)을 통해 매트릭셀 그룹과 비교하여 유의적으로(p -value < 0.05 , FDR < 0.1) 1.2배 이상 증가한 유전자를 분석한 결과 시냅스 화학적 신호 전달과 관련된 많은 유전자의 발현이 증가하였다.
- [0149] 도 17을 참조하면, KEG pathway를 통해 매트릭셀 그룹과 비교하여 유의적으로(p -value < 0.05 , FDR < 0.1) 1.2배 이상 증가한 유전자를 분석한 결과, 다양한 subtype의 뉴런 시냅스와 관련된 유전자의 발현이 증가하였다.
- [0150] 전술한 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. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0151] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

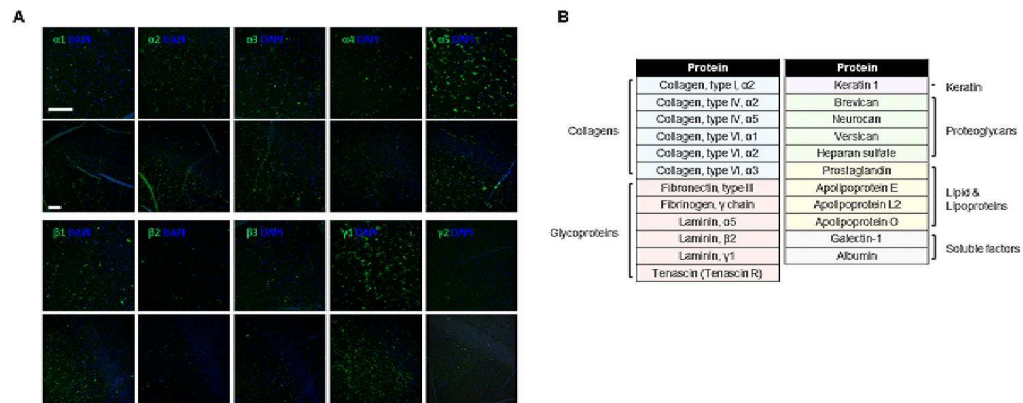
도면1



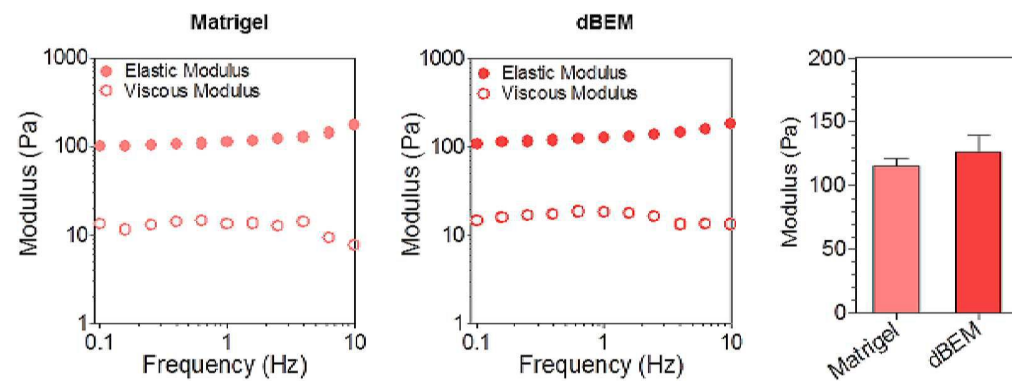
도면2



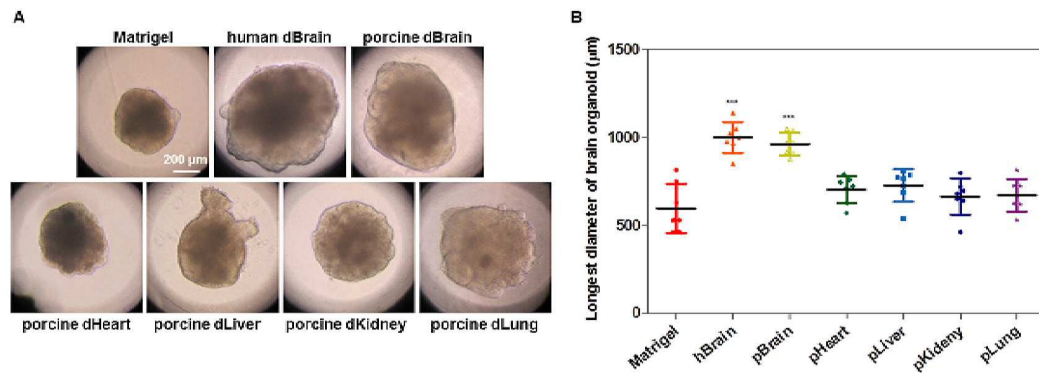
도면3



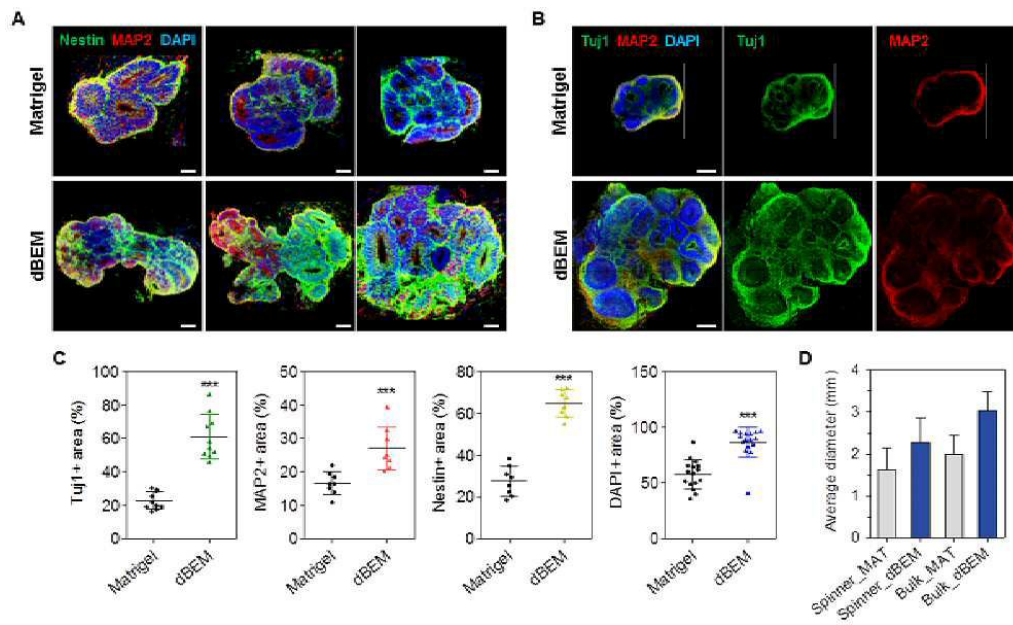
도면4



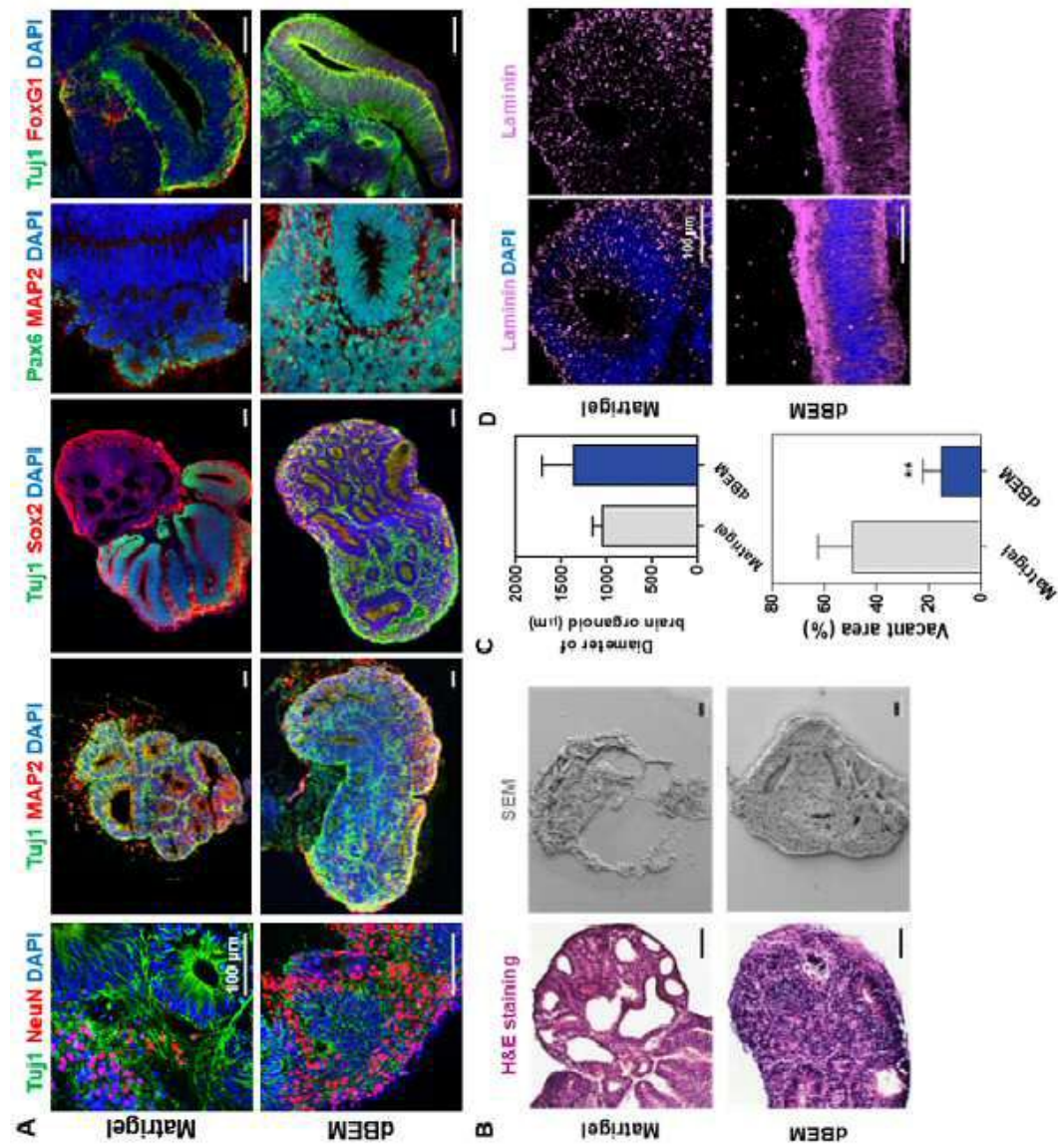
도면5



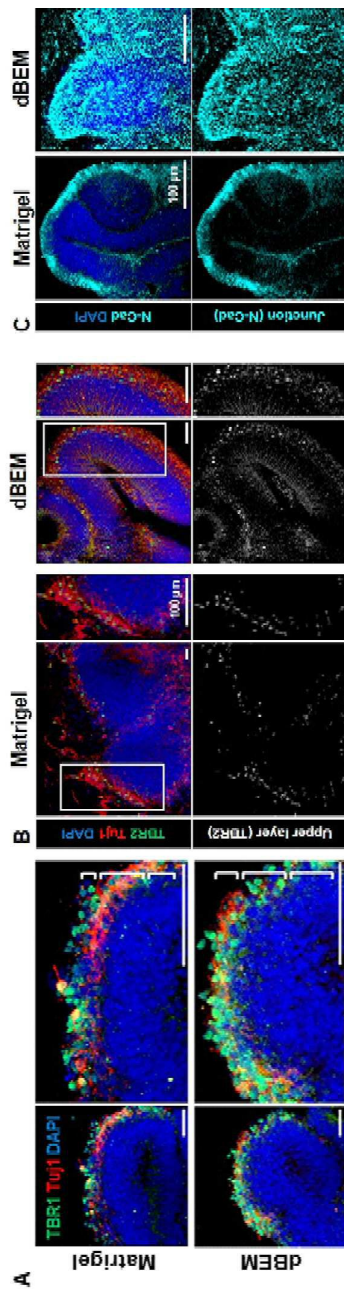
도면6



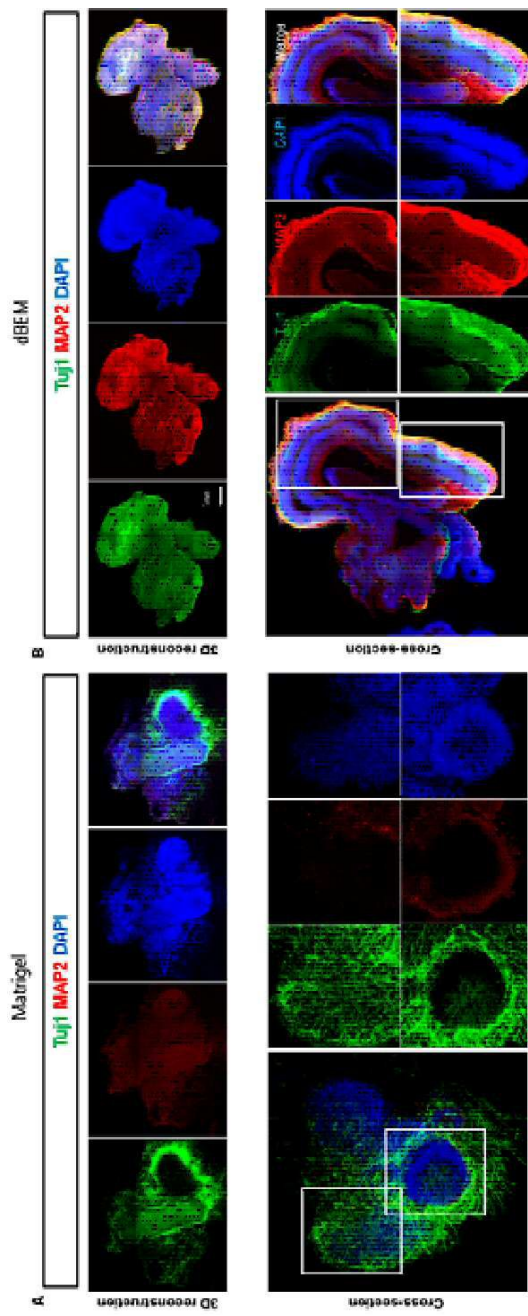
도면7



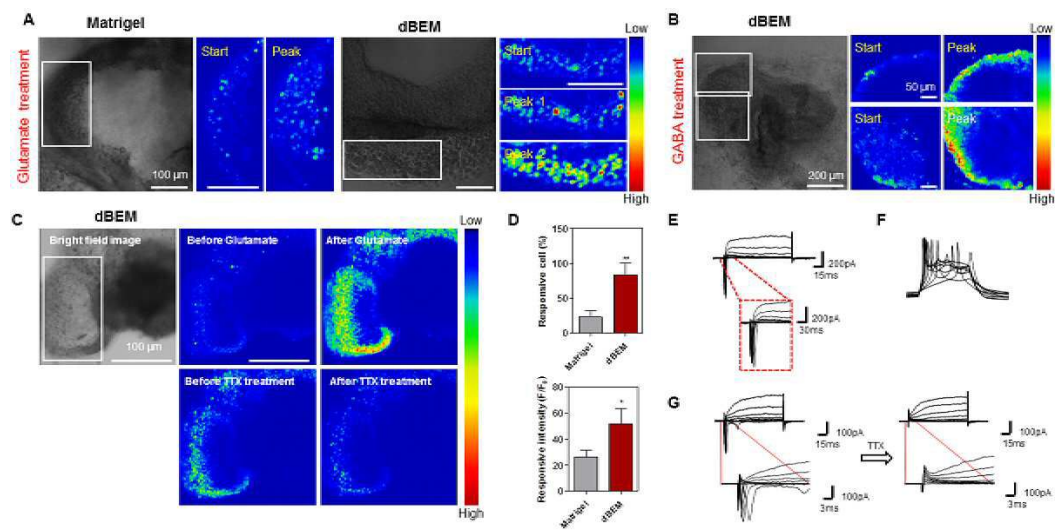
도면8



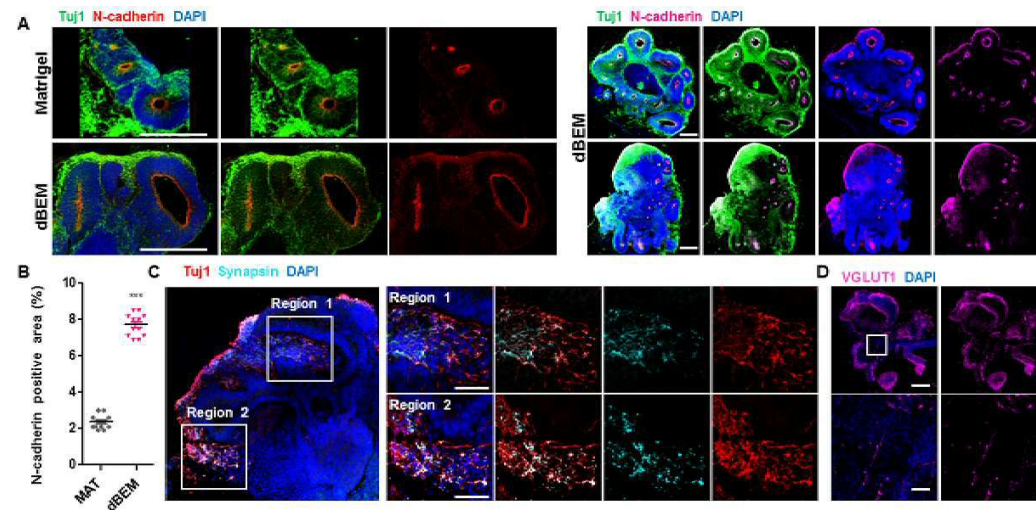
도면9



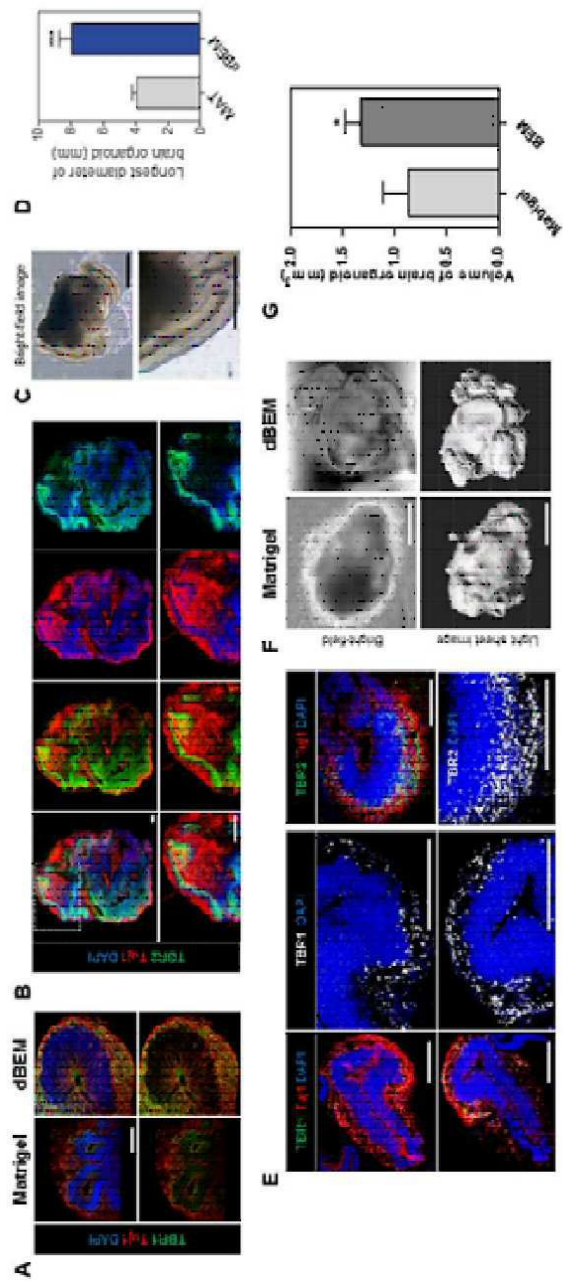
도면10



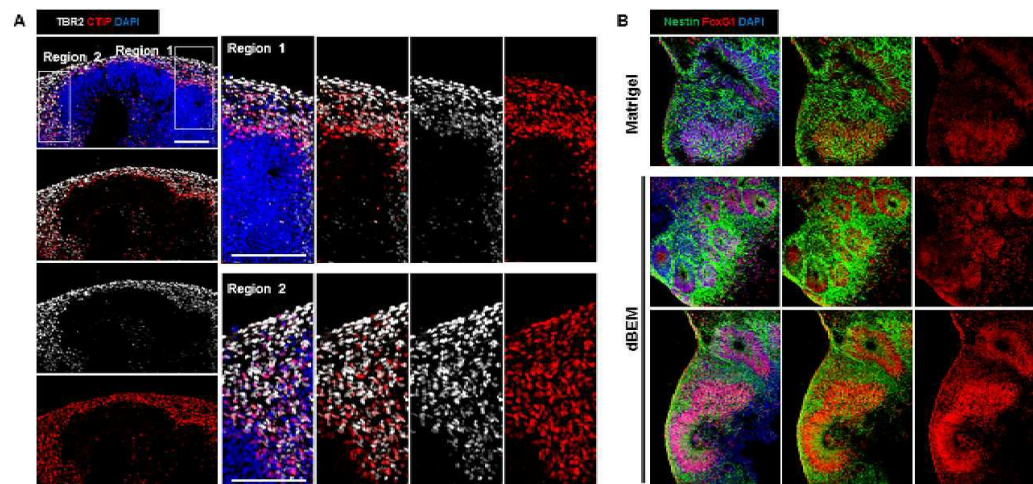
도면11



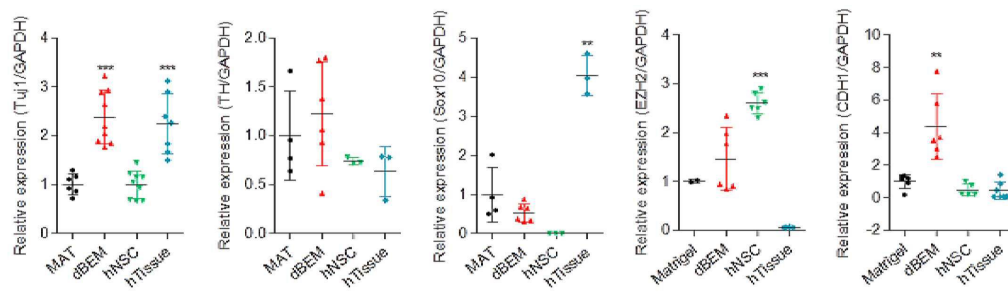
도면12



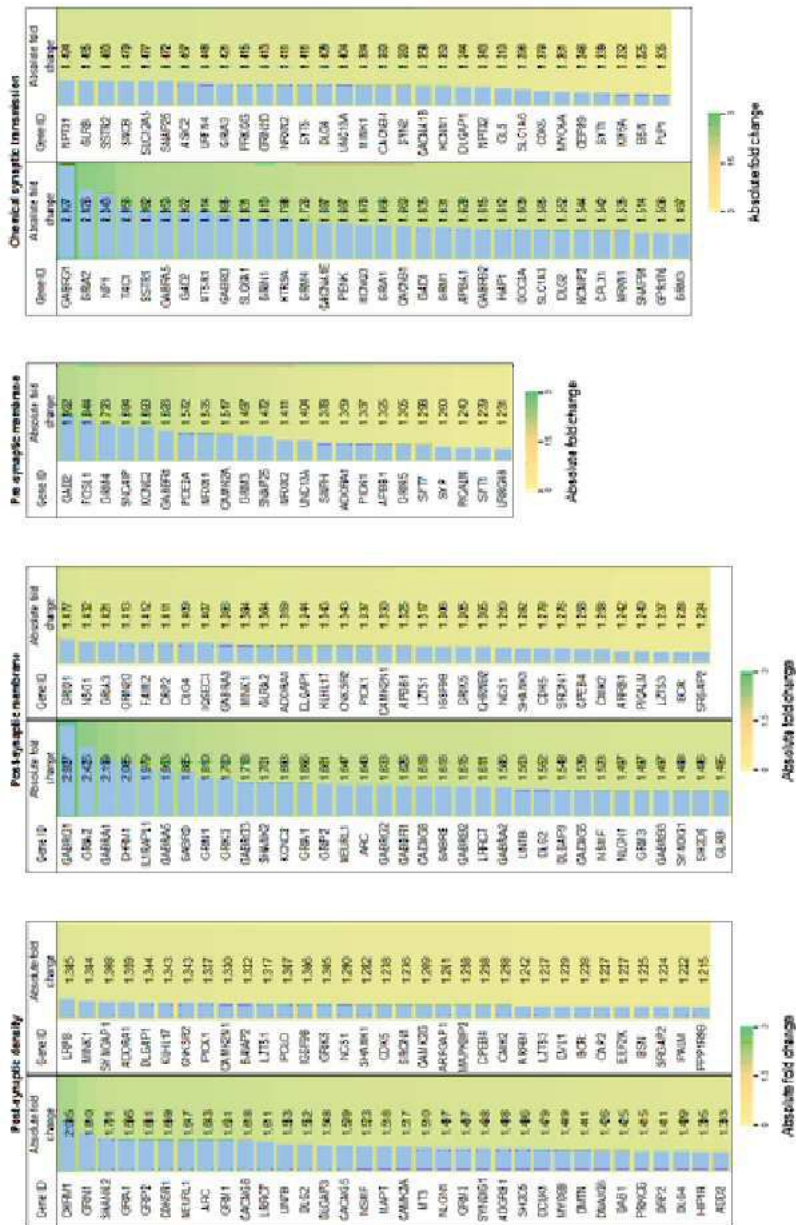
도면13



도면14



도면16



도면17

