

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0068174

(43) 공개일자 2022년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12N 5/071* (2010.01) *C12M 3/00* (2006.01)*C12N 5/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*C12N 5/0686* (2013.01)*C12M 21/08* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0157357

(22) 출원일자 2021년11월16일

심사청구일자 2021년11월16일

(30) 우선권주장

1020200153719 2020년11월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

조승우

서울특별시 서대문구 연세로50 연세대학교 공학원 347호

김유혼

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 제2공학관 533호

최이선

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 제2공학관 533호

(74) 대리인

특허법인 피씨알

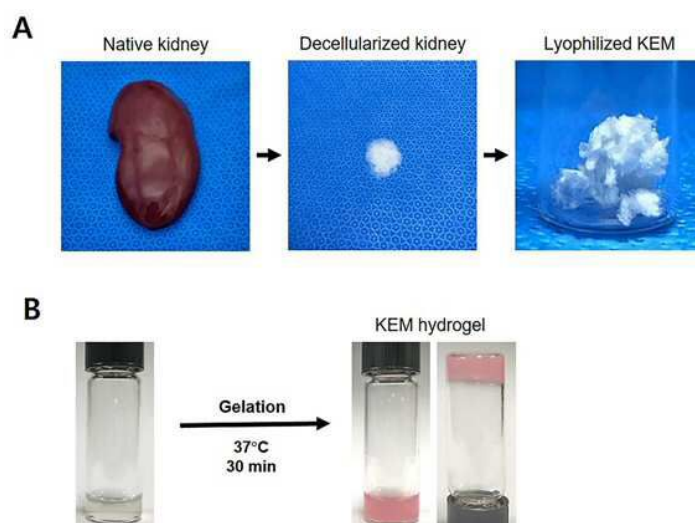
전체 청구항 수 : 총 8 항

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

## (57) 요약

본 발명은 탈세포 신장 조직(Kidney Extracellular Matrix; KEM)을 이용한 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0062** (2013.01)

**C12N 5/0697** (2013.01)

**C12N 2533/90** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |  |
|-------------|--|
| 과제고유번호      | 1711132427                                   |
| 과제번호        | 2018M3A9H1021382                             |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                    |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                       |
| 연구사업명       | 바이오·의료기술개발(R&D)                              |
| 연구과제명       | 간 조직 특이적 매트릭스와 마이크로 디바이스를 이용한 간 오가노이드 생산 플랫폼 |
| 개발          |  |
| 기 여 율       | 1/2  |
| 과제수행기관명     | 연세대학교  |
| 연구기간        | 2021.01.01 ~ 2021.12.31                      |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711127638                            |
| 과제번호        | 2021R1A2C3004262                      |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                             |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                |
| 연구사업명       | 개인기초연구(과기정통부)(R&D)                    |
| 연구과제명       | 오가노이드 모듈 합체·정렬 기술을 통한 바이오 인공 장기 생산 연구 |
| 기 여 율       | 1/2                                   |
| 과제수행기관명     | 연세대학교                                 |
| 연구기간        | 2021.03.01 ~ 2022.02.28               |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

신장 조직 유래 세포외기질(Kidney Extracellular Matrix; KEM)을 이용한 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신장 조직 유래 세포외기질은 Triton X-100 및 수산화암모늄을 혼합한 용액을 이용하여 제조된 것인, 지지체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 지지체 내 상기 신장 조직 유래 세포외기질의 농도는 1 mg/ml 내지 10 mg/ml인, 지지체.

#### 청구항 4

1) 분리된 신장 조직을 파쇄하는 단계; 및

2) 상기 파쇄된 신장 조직에 Triton X-100 및 수산화 암모늄을 처리하여 탈세포하여 탈세포된 신장 조직 유래 세포외기질 (KEM)을 제조하는 단계

를 포함하는 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 2) 단계 이후 3) 상기 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 (KEM)을 동결건조 하여 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 제조하는 단계를 더 포함하는 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 3) 단계 이후 4) 상기 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 하이드로젤 형태의 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체로 형성하는 단계를 더 포함하는 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 4) 단계는 상기 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 펩신 용액에 용해시켜 용액화 한 뒤 pH를 조정하여

하이드로젤화 하는 것인 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법.

## 청구항 8

제1항의 지지체 또는 제4항의 제조방법에 의해 제조된 지지체에서 신장 오가노이드를 배양하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

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

### 배경 기술

[0003] 기존의 2차원 세포 배양법은 실제 생체 내 미세환경을 구현하는데 한계가 있기 때문에 배양 효율이 낮으며 따라서 2D 세포주는 체외 모델로서 한계가 있다. 이러한 한계점을 개선하기 위한 새로운 방안으로 최근 3차원 오가노이드 배양 기술이 큰 각광을 받고 있는데 오가노이드는 신약 스크리닝, 약물 독성 평가, 질환 모델링, 세포 치료제, 조직공학 등 다양한 임상적 적용이 가능한 조직 유사체로서 전 세계적으로 급격하게 성장하고 있는 기술이다. 오가노이드는 삼차원 구조체 내에 인체의 특정 장기 및 조직을 구성하는 다양한 세포로 이루어져 있을 뿐만 아니라 이들 간의 복합적인 상호 작용을 구현할 수 있기 때문에 단순 2D 세포주 모델이나 동물 모델과 같은 기존에 주로 이용되던 약물 평가 모델과 비교해서 훨씬 정확한 체외 모델 플랫폼으로 적용이 가능하다.

[0004] 전세계적으로 다양한 장기 유래 오가노이드 플랫폼들이 구축되었고 현재까지도 관련 연구가 활발히 진행중인데, 현재까지 오가노이드를 배양하기 위해 배양 지지체로서 공통적으로 매트릭스(Matrigel) 제품을 이용하고 있다. 하지만 매트릭스는 쥐의 육종암 조직에서 추출한 성분이기 때문에, 제품의 품질을 균일하게 유지하기 어려우며 고가이고 동물성 감염균 및 바이러스 전이 등 안전성 측면에서 문제가 있어 오가노이드 배양 시스템으로서 매트릭스는 해결해야 하는 많은 문제점을 가지고 있다. 특히, 암 조직 유래의 소재로서 특정 조직 오가노이드 배양을 위해 필요한 최적의 조직 특이적 미세환경을 제공해 주지 못한다. 매트릭스를 대체하기 위한 고분자 기반 하이드로젤 개발 연구가 일부 진행되어 왔으나 아직까지 매트릭스를 대체할만한 수준의 소재는 보고된 바 없다.

[0005] 신장 오가노이드는 신장 조직에서 성체줄기세포를 추출하여 배양하거나 인간 유도만능줄기세포 또는 배아줄기세포와 같은 전분화능 줄기세포로부터 제작할 수 있다. 그러나 신장 오가노이드 배양을 위해 사용되는 매트릭스는 생체 내 복합적인 신장 조직 특이적 미세환경을 구현하지 못하기 때문에 신장 오가노이드 분화 효율 및 기능을 향상시켜야 할 필요가 있다. 따라서 보다 성숙하고 기능적인 신장 오가노이드를 제작하기 위한 새로운 배양 시스템의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0006] 말기 신부전, 만성 신장염 등 난치성 신장 질환은 마땅한 치료제가 없어 환자가 평생 혈액 투석을 해야 하거나 신장 이식을 받아야 하기 때문에 일상 생활이 어려워져 환자의 삶의 질이 크게 저하되고 신장 이식 후 면역억제제 복용 및 부작용으로 인해 큰 고통을 받는 심각한 질환이다. 따라서 신장 질환 치료제 개발을 위한 정밀한 체외모델로서 신장 오가노이드를 효율적으로 배양할 수 있는 시스템 개발은 보건의료 관점에서 매우 중요한 이슈이다.

[0007] 본 발명에서는 신장 조직의 탈세포 공정을 통해 신장 조직 특이적 세포외기질 성분으로 구성된 하이드로젤 매트릭스 제작하고 이를 신장 오가노이드 배양에 적용하였다. 기존 장기 탈세포 방법과 비교하여 본 발명에서는 탈세포 공정을 단순화하여 매트릭스 제작 과정이 매우 용이할 뿐 아니라 신장 조직 특이적 세포외기질 성분 및 성장인자가 잘 보존되어 신장 오가노이드의 효율적인 생장 및 분화를 유도할 수 있음을 확인하여 기존 매트릭스를 대체할 수 있는 배양 매트릭스로서의 가능성을 검증하였다.

## 선행기술문헌

## 특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR10-2021-0069619A

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 돼지 신장 조직을 화학적 처리하여 대량의 탈세포 조직을 얻고 이를 기반으로 하이드로젤 지지체를 제작하여 신장 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.

[0018] 본 발명의 일 양상은 신장 조직 유래 세포외기질(Kidney Extracellular Matrix; KEM)을 이용한 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체를 제공한다.

[0019] 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.

[0020] 상기 세포외기질은 콜라겐(collagens), 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸(proteoglycans), 항균제(antimicrobials), 화학유인물질(chemoattractants), 시토카인(cytokines), 및 성장 인자에 제한되지 않는, 구조형 및 비구조형 생체 분자(biomolecules)의 혼합물일 수 있다.

[0021] 상기 세포외기질은 포유 동물에 있어서 다양한 형태로써 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.

[0022] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.

[0023] 본 발명의 일 구체예로 상기 신장 조직 유래 세포외기질은 Triton X-100 및 수산화암모늄을 혼합한 용액을 이용하여 제조된 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예로 상기 지지체 내 상기 신장 조직 유래 세포외기질의 농도는 1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 구체적으로는 1 mg/ml 내지 7 mg/ml 일 수 있다. 상기 신장 세포외기질의 농도의 예시로, 1 mg/ml 내지 7 mg/ml, 1

mg/ml 내지 5 mg/ml, 1 mg/ml 내지 3 mg/ml, 3 mg/ml 내지 7 mg/ml, 3 mg/ml 내지 5 mg/ml 또는 5 mg/ml 내지 7 mg/ml 일 수 있고, 일 실시예로 1 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml 또는 7 mg/ml 일 수 있다. 상기 범위의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없다.

- [0025] 상기 지지체는 탈세포화하여 수득한 신장 조직 유래 세포외기질을 기반으로 제조한 3차원 하이드로젤을 포함하며, 신장 오가노이드 배양에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0026] 상기 탈세포화된 신장 조직은 실제 조직 특이적 세포외기질 성분을 포함하므로 해당 조직의 물리적, 기계적, 생화학적 환경을 제공할 수 있으며, 신장 조직 세포로의 분화 및 조직 특이적 기능성을 증진시키는데 매우 효율적이다.
- [0027] 상기 “오가노이드(organoid)”는 조직 또는 전분화능줄기세포에서 유래된 세포를 3D 형태로 배양하여 인공장기와 같은 형태로 제작한 초소형 생체기관을 의미한다.
- [0028] 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.
- [0029] 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.
- [0031] 본 발명의 다른 일 양상은 1) 분리된 신장 조직을 파쇄하는 단계; 및 2) 상기 파쇄된 신장 조직에 Triton X-100 및 수산화 암모늄을 처리하여 탈세포하여 탈세포된 신장 조직 유래 세포외기질 (KEM)을 제조하는 단계를 포함하는 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법을 제공한다.
- [0032] 상기 1) 단계는 분리된 신장 조직을 파쇄하는 단계로, 상기 신장 조직은 공지의 동물에서 분리된 것일 수 있고, 상기 동물의 구체적인 예시로, 소, 돼지, 원숭이, 인간 등일 수 있다. 또한 본 발명에서는 상기 분리된 신장 조직을 파쇄한 뒤 탈세포 처리하기 때문에 탈세포의 효율이 높다. 분리된 신장 조직을 파쇄하는 방법은 공지의 방법으로 이루어질 수 있다. 본 발명은 상기 신장 조직을 파쇄하여 탈세포 공정을 거쳤기 때문에 더 효율적이고 높은 수준의 세포 제거가 가능하다.
- [0033] 상기 2) 단계는 상기 파쇄된 신장 조직에 Triton X-100 및 수산화 암모늄을 처리하여 탈세포하여 탈세포된 신장 조직 유래 세포외기질 (KEM)을 제조하는 단계이다. 본 발명은 기존의 탈세포 방식과 달리 Triton X-100 및 수산화 암모늄 만을 처리하여, 조직 손상을 최소화함으로써 신장 조직 내의 다양한 단백질들이 더 많이 보존될 수 있다. 구체적인 예시로 파쇄된 신장 조직을 Triton X-100 및 수산화 암모늄을 함께 교반하면서 탈세포 공정이 이루어질 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예로 상기 2) 단계 이후 3) 상기 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 (KEM)을 동결건조 하여 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 제조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 3) 단계는 상기 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 (KEM)을 동결건조 하여 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 제조하는 단계이다. 상기 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질은 멸균을 위해 건조 후 전자 빔, 감마 방사선, 에틸렌 옥사이드 가스 또는 초임계 이산화탄소에 노출시킬 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 구체예로 상기 3) 단계 이후 4) 상기 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 하이드로젤 형태의 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체로 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 4) 단계는 상기 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 하이드로젤 형태의 신장 오가노이드 배양 및 이식용 지지체로 형성하는 단계이다. 상기 단계는 젤화 (gelation)를 통해 이루어질 수 있으며, 구체적으로는 상기 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 펩신 용액에 용해시켜 용액화 한 뒤 pH를 조정하여 하이드로젤화하는 것일 수 있다. 상기 탈세포 신장 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.
- [0038] 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.

[0039] 상기 젤화는 동결건조 신장 조직 유래 세포외기질을 산성 용액에서 캡신 또는 트립신과 같은 단백질을 분해 효소로 용액화하고, pH를 조정, 구체적으로 10X PBS와 1 M NaOH를 이용하여 중성 pH와 1X PBS 버퍼의 전해질 상태로 맞추고 37℃의 온도에서 30분 동안 이루어지는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 지지체 또는 상기 제조방법에 의해 제조된 지지체에서 신장 오가노이드를 배양하는 방법을 제공한다.

[0042] 기존의 매트릭젤 기반 배양 시스템은 동물 암조직 유래의 추출물로서 배치 간의 차이가 크고 실제 간의 환경을 모사해주지 못하고, 신장 오가노이드로 분화, 발달되는 효율이 미흡한 반면, 상기 지지체는 신장 조직 유사 환경을 조성할 수 있으므로 신장 오가노이드 배양에 있어서 적합하다.

[0043] 상기 배양은 적합한 조건에서 세포를 유지 및 성장시키는 과정을 의미하며, 적합한 조건은 예컨대, 세포가 유지되는 온도, 영양소 가용성, 대기 CO<sub>2</sub> 함량 및 세포 밀도를 의미할 수 있다.

[0044] 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

[0046] 본 발명에서 개발된 탈세포 지지체를 이용하면 신장 오가노이드의 효율적인 배양이 가능하므로 여러가지 문제점을 가지고 있는 기존 매트릭젤을 대체하여 신약 개발, 약물 독성 및 유효성 평가, 환자 맞춤형 약물 선별 등의 의료 산업 분야에 광범위하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 이를 통해 보건사회적으로 국민의 삶의 질 향상과 더불어 경제/산업적으로도 큰 부가가치를 창출할 것이라고 전망한다.

[0047] 탈세포 신장 조직 유래 인공 매트릭스 지지체는 다양한 난치성 신장 질환(급성/만성 신장염, 신부전 등)을 체외에서 구현하고 그 기전을 밝히는 질병 모델링 연구 및 이식 치료 플랫폼 구축 등 다양한 분야에서 광범위하게 이용 가능할 것으로 기대된다. 이러한 난치성 신장 질환은 최근 유병률이 크게 증가하여 많은 연구가 필요한 상황이므로 관련 기초연구를 위한 연구용 소재로서도 수익 창출이 가능하다.

[0048] 신장 오가노이드는 질환 모델뿐 아니라 재생의학적 목적의 세포 치료제 및 조직 재생 치료제로서 무궁한 가능성을 가진다. 말기 신부전 환자의 경우 혈액 투석으로 인해 일상적인 생활이 불가능한데 본 발명에서 개발된 탈세포 신장 유래 지지체를 이용한 신장 오가노이드 이식 치료를 통해 근본적인 신장 질환 치료가 가능하게 된다면 환자의 삶의 질을 크게 향상시킬 수 있으며 관련 비용을 크게 절감할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 개발된 인공 지지체는 줄기세포 유래 신장 오가노이드 뿐 아니라 신장암 오가노이드 배양에도 적용이 가능하므로 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.

[0050] 종합하면 위에서 기술했듯이 신장 오가노이드의 배양 및 응용을 위해서 필수적으로 요구되는 매트릭젤과 비교하여 본 발명에서 개발된 인공 지지체는 배양 시스템으로서 매트릭젤 이상의 기능성을 보여주며 보다 안전하고 비용적인 측면에서도 매우 유리한 장점을 가지고 있다. 따라서 이러한 매트릭젤 대체 효과만으로도 막대한 경제적 수익 창출이 예측된다.

## 도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질(Kidney Extracellular Matrix; KEM) 지지체 제작 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 KEM 지지체를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 탈세포 신장 조직 유래 하이드로젤 지지체의 KEM 농도에 따른 물성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 (Kidney Extracellular Matrix, KEM)의 단백체를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 (Kidney Extracellular Matrix, KEM)과 매트릭스의 단백체를 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6는 신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체의 최적 농도 선정을 위한 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 신장 오가노이드의 증식 및 분화 마커 발현 분석(세포 면역염색 분석) 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체에서 형성된 신장 오가노이드 성장 양상을 나타낸 것이다.

도 9는 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)에서 장기 배양한 신장 오가노이드를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 10 및 11은 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)의 장기 보관 가능성을 검증한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)의 조직 특이적 효과를 확인한 결과이다.

도 13은 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)에서 배양된 신장 오가노이드의 기능성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)에서 배양된 신장 오가노이드를 이용하여 신장 섬유증 모델을 제작한 결과이다.

도 15는 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 (Kidney Extracellular Matrix, KEM) 지지체의 생체적합성을 확인한 결과이다.

도 16 및 17은 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)를 이용한 신장 오가노이드 생체 내 이식의 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0053] 본 발명에서 개발된 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체는 최소화된 화학적 처리 방식을 통해 제작이 가능하기 때문에 기존의 탈세포 방식으로 제조된 지지체와 비교하여 조직 특이적 성분의 손상이 적고 제작 시간 및 비용 절감 측면에서 더욱 효율적이며 대량 생산도 용이한 장점이 있다. 따라서, 기존 탈세포 매트릭스와 비교하여 상용화 측면에서 더욱 유리할 것으로 전망된다.
- [0054] 본 발명에서 개발된 탈세포 신장 조직 유래 지지체는 면역원성을 지니는 세포들이 모두 제거된 반면, 실제 신장 조직에 함유된 다양한 세포외기질 성분 및 성장인자들은 잘 보존되어 있음을 확인하였다. 단백질 분석을 통해 신장 조직에 중요한 세포외기질 성분 및 관련 단백질들을 파악하였다. 따라서 탈세포 신장 조직 유래 매트릭스는 신장 조직 특이적 미세환경을 제공하여 신장 오가노이드의 효율적인 배양을 가능하게 하였다.
- [0055] 실제로 본 발명에서는 개발된 탈세포 신장 조직 유래 하이드로젤 내에서 신장 오가노이드의 형성과 분화가 성공적으로 유도됨을 확인하였다. 다양한 세포외기질 농도의 탈세포 지지체를 제작하고 이를 신장 오가노이드 배양에 적용하여 가장 효율적인 신장 오가노이드 배양이 가능한 최적의 농도 조건을 선정하였다.
- [0056] 개발된 탈세포 지지체에서 배양한 신장 오가노이드와 대조군으로 사용된 매트릭스 지지체에서 배양한 신장 오가노이드를 비교 분석해 보았을 때, 탈세포 지지체에서 배양한 신장 오가노이드의 분화가 더 증진되었음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 탈세포 지지체에서 배양한 신장 오가노이드가 기존의 방식으로 배양한 신장 오가노이드보다 실제 신장 조직을 더욱 정확하고 정밀하게 재현할 수 있음을 확인하였다. 결과적으로 탈세포 신장 조직 유래 지지체가 실제로 신장 오가노이드의 효율적인 분화와 발달에 기여함을 확인하여 매트릭스 대체제로서의 가능성을 보여준다.



[0058] 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.

[0060] **신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질(Kidney Extracellular Matrix; KEM) 지지체 제작(도 1)**

[0061] 신장 오가노이드 배양 지지체를 제작하기 위하여 돼지 신장 조직을 탈세포 공정 처리하여 세포외기질 기반 지지체(Kidney Extracellular Matrix; KEM)를 제작하였다. 본 발명에서 사용된 탈세포 공정은 기존 방식보다 완화된 조건인 1% Triton X-100과 0.1% ammonium hydroxide를 혼합한 용액만을 사용한다는 점에서 기존의 탈세포 방법들과 차별화를 두었고, 따라서 조직 손상을 최소화함으로써 신장 조직 내의 다양한 세포외기질 및 성장인자 단백질들을 더 많이 보존할 수 있었다. 또한, 신장 조직을 잘게 자른 후에 탈세포화 처리를 진행하였기 때문에 조직으로부터 더욱 효과적이고 확실한 세포 성분(DNA) 제거가 가능하다는 장점을 보유하였다.

[0062] (A) 돼지 신장 조직을 작은 조각들로 자른 다음 일련의 화학적 처리를 거쳐 조직 내 대부분의 세포들을 제거하여 탈세포화를 진행하였다. 그 후 이를 동결 건조하여 파우더 형태의 탈세포 신장 조직 매트릭스(Lyophilized KEM)를 제작하였다.

[0063] (B) 신장 조직의 세포외기질을 함유하는 파우더 형태의 탈세포 신장 조직 매트릭스(Lyophilized KEM) 10 mg에 4 mg/ml 펩신 용액(돼지 위 점막 유래 펩신 파우더 4 mg를 0.02 M HCL 1 ml에 녹인 용액)을 처리한 후 상온에서 48시간 동안 용액화 시켰다. 10X PBS와 1 M NaOH를 용액화된 KEM에 알맞은 비율로 첨가하고 균일하게 섞어주어 세포 배양이 가능한 중성 pH와 1X PBS 버퍼의 전해질 상태로 맞추어 주었다. 마지막으로 인큐베이터 내 37℃ 온도 조건에서 30분 동안 겔화(gelation)을 유도하였다. 유리 용기에서 겔화를 유도하여 형성된 KEM 하이드로젤이 용기를 뒤집어도 흘러내리지 않는다는 것을 통해 온도에 따른 가교반응을 통하여 고형화된 하이드로젤이 제조되었음을 확인하였다.

[0065] **신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 KEM 지지체 분석(도 2)**

[0066] 돼지의 신장 조직으로부터 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)를 제작하고 특성을 분석하였다.

[0067] (A) H&E 조직 염색 분석을 통해 탈세포 과정 후, 조직의 세포핵이 대부분 제거된 반면 전반적인 구조는 잘 유지가 되어있는 것을 확인하였다. 또한 Masson's Trichrome 염색을 통해 collagen 역시 잘 보존된 것을 확인하였고, Alcian blue 염색을 통해 GAG 성분이 잘 보존되어 유지되는 것을 확인하였다.

[0068] (B) 탈세포 과정 후에도 신장 조직의 ECM 단백질이 잘 보존되는지 확인하기 위해 면역염색을 진행하였다. 탈세포 공정 이후에도 fibronectin과 laminin과 같은 주요 ECM 단백질들이 잘 유지되었음을 확인하였다.

[0069] (C) 주사전자현미경 (Scanning electron microscopy, SEM)을 이용해 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤의 내부 구조를 관찰했을 때 콜라겐 나노섬유 특이적인 다공성 미세구조로 구성되어 있음을 확인하였다. 따라서 KEM 하이드로젤이 신장 오가노이드 배양에 적합한 구조적 미세환경을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

[0070] (D) 탈세포 전 신장 조직 (Native)과 탈세포 후 신장 조직 (Decell)에 대해서 DNA 정량과 GAG (Glycosaminoglycans) 정량 분석을 실시하였다. 탈세포 전후 결과를 비교해 보았을 때 탈세포 공정 후에 DNA가 96.8% 이상 제거되어 효율적으로 세포가 제거되었음을 확인하였다. 또한, 탈세포 공정 후에도 GAG는 실제 신장 조직과 비슷한 수준으로 잘 보존되었음을 확인하였고, collagen 역시 잘 유지되어 존재하는 것을 확인하였다.

[0072] **탈세포 신장 조직 유래 하이드로젤 지지체의 KEM 농도에 따른 물성 분석(도 3)**

[0073] 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질(KEM)을 이용하여 4가지 농도의 하이드로젤 지지체를 제작한 뒤, 각 농도에 따른 물성 변화를 측정하였다. 모든 농도 조건의 젤은 37℃의 인큐베이터에서 30분 동안의 가교반응을 통해 제작되었다. 가장 낮은 농도인 1 mg/ml의 농도 조건을 포함한 모든 농도 조건에서 storage modulus( $G'$ ) 값이 loss modulus( $G''$ ) 값 보다 일관되게 높음을 확인하였다. 이로 인해 하이드로젤 내 가교를 통해 안정적인 고분

자 네트워크가 형성됨을 확인했고 KEM 농도가 증가할수록 기계적 물성(modulus)도 높아지는 것을 확인하였다.

[0075] **신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 KEM 지지체의 단백질 분석(도 4)**

[0076] 탈세포 신장 조직 유래 KEM 지지체에 함유된 세포외기질 성분을 확인하기 위해 단백질 분석 (Proteomics)을 실시하였다.

[0077] 단백질 분석을 통해 제작된 탈세포 신장 조직 유래 지지체인 KEM 하이드로젤에는 다양한 종류의 collagens, glycoproteins, proteoglycans 등의 세포외기질 성분들이 포함되어 있고, 이 외에도 조직 내 세포에서 분비되어 주로 세포외기질과 결합되어 있는 상태로 존재하는, 성장인자, 응고인자, 사이토카인 등의 다양한 인자 (secreted factors)들도 함께 함유되어 있다는 것을 확인하였다.

[0078] KEM 하이드로젤을 구성하는 주요 10가지 ECM 중에서 큰 비중을 차지하는 collagen type VI (COL6)는 신장 사구체 세포외기질의 주요 구성 성분으로서 신장 조직형성에 중요한 역할을 수행하고, Laminin (LAM) 당단백질은 기저막의 주요 성분으로서 신장세포 및 조직 분화, 항상성 및 생존에 관여하였다. 또한, biglycan (BGN) 프로테오글리칸은 신장의 면역반응의 조절에 있어서 중요한 매개자 역할을 한다.

[0079] 이에 더해 KEM 지지체에는 다른 조직에 비해 신장 조직에서 4배 이상 발현이 높은 단백질 (Top 10 kidney-elevated protein)들이 존재한다는 것을 확인하였다.

[0080] 따라서, KEM 하이드로젤 내에서 관찰되는 실제 신장 조직에 존재하는 이러한 다양한 단백질들이 신장 오가노이드 형성 및 발달을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

[0082] **신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 KEM과 매트릭셀 지지체의 단백질 비교 분석(도 5)**

[0083] 신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 KEM과 매트릭셀 지지체의 단백질을 비교 분석하였다. 구체적으로

[0084] (A) 탈세포 신장 조직 유래 KEM 지지체와 매트릭셀의 구성성분 비교 결과, 매트릭셀은 대부분이 glycoproteins 으로부터 이루어진 반면, KEM은 glycoproteins을 포함한 다양한 collagens와 proteoglycans 등으로 구성되어 있음을 확인하였다.

[0085] (B) 유전자 온톨로지(Gene Ontology) 분석을 통해 탈세포 신장 조직 유래 KEM 지지체에 포함된 주요 Top 10 ECM 성분의 기능과 기존의 매트릭셀 지지체의 주성분의 기능을 비교해 보았을 때, KEM 지지체에 신장이 관여하는 질소화합물 대사 과정과 관련된 단백질들이 매트릭셀 보다 더 많이 존재함을 확인하였다.

[0086] (C) 매트릭셀과 KEM의 단백질 발현 패턴을 비교하기 위해 히트맵 (heatmap)과 volcano plot으로 분석한 결과, 두 지지체에 포함되어 있는 단백질들의 구성이 매우 상이한 것을 확인하였다. 또한, volcano plot 분석을 통해 각 지지체에서 유의미하게 더 많이 발현되는 단백질들끼리 비교해 보았을 때에도 발현 경향이 확연히 다른 것을 확인하였다.

[0088] **신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체의 최적 농도 선정(도 6)**

[0089] 마우스 신장 조직으로부터 tubular fragment를 추출하였다. 신장 오가노이드 배양에 가장 적합한 최적농도의 KEM 하이드로젤을 선정하기 위해 우선 다양한 농도 조건의 KEM 하이드로젤을 제작하였다. 추출한 tubular fragment를 각 농도의 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체에 균일하게 섞어준 후 삼차원 배양을 진행하여 신장 오가노이드의 형성을 유도하였다. 배양 7일차에 계대 배양을 진행하고 5일 동안 추가 배양하여, 총 배양 12일차에 각 KEM 농도 조건에서 형성된 신장 오가노이드의 형태와 형성 효율 그리고 유전자 발현을 확인하였다. 매트릭셀은 대조군으로 이용되었다.

[0090] (A) 1 mg/ml의 농도 조건을 제외한 나머지 농도 조건의 KEM 하이드로젤에서 신장 오가노이드가 형성되었으며 대조군으로 이용된 매트릭셀에서 배양된 오가노이드와 유사하게 구형의 형태로 형성되는 것을 확인하였다. 1 mg/ml 농도의 하이드로젤에서는 오가노이드가 형성되지 않았다.

[0091] (B) 계대배양 시점을 기준으로 0일차와 5일차의 오가노이드 수를 각각 측정한 후 이를 비율로 나타내어 형성 효

율을 측정하였다. 각 KEM 농도 별로 신장 오가노이드의 형성 효율을 비교해 보았을 때, KEM 하이드로젤에서의 형성 효율이 전반적으로 매트리지젤에 비해 낮지만, 7 mg/ml 농도의 KEM 하이드로젤에서 가장 높은 형성 효율을 보여줌을 확인하였다.

[0092] (C) 각 농도별로 제작된 KEM 하이드로젤에서 12일간 신장 오가노이드를 배양한 후, 분화 마커에 대한 유전자 발현을 정량적 qPCR 분석을 통해 비교 분석하였다. 신장의 특정세포에서 발현하는 유전자인 Aqp1(proximal tubule cell)은 KEM의 농도가 증가할수록 낮아지는 경향을 보이지만 모든 농도의 KEM에서 매트리지젤 그룹 보다 유의미하게 높고, Sc112a1(loop of Henle cell)은 대체로 매트리지젤 그룹과 유사한 발현 수준으로 보이나 7 mg/ml 농도의 KEM에서는 유의미하게 증가하였다. 또한 Aqp2(collecting duct cell) 유전자는 7 mg/ml 농도의 KEM에서 매트리지젤 그룹과 가장 유사한 수준으로 발현되었다.

[0093] 위의 분석들을 통하여 1 mg/ml 농도의 KEM 하이드로젤을 제외한 모든 농도에서 오가노이드의 배양은 가능하지만, 종합적으로 보았을 때 7 mg/ml KEM 농도 조건에서 신장 오가노이드의 분화능이 가장 우수함을 확인하였다.

[0095] **탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 신장 오가노이드의 증식 및 분화 마커 발현 분석(세포 면역염색 분석)(도 7)**

[0096] 배양 12일 차에 면역염색을 통해 각종 마커 발현 분석을 진행해 보았을 때, 신장 오가노이드 특이적인 분화 마커인 AQP3(collecting duct cell)과 CALB1(distal tubule cell) 모두 대조군인 매트리지젤과 모두 비슷한 수준으로 잘 발현이 되는 것을 확인하였다.

[0097] 또한, 세포 간 밀착연접(tight-junction)에 관여하는 마커인 ZO-1도 모든 농도의 KEM 하이드로젤에서 배양된 신장 오가노이드에서 잘 발현되는 것을 확인하였다.

[0098] 오가노이드의 증식과 관련된 마커인 KI67 역시 모든 농도의 KEM 하이드로젤에서 배양된 신장 오가노이드에서 잘 발현이 되는 것을 확인하였다.

[0100] **탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체에서 형성된 신장 오가노이드 성장 양상(도 8)**

[0101] 배양 7일차에 계대 배양을 진행한 이후로부터 Day 1 ~ Day 4까지 매트리지젤과 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤(5 mg/ml, 7mg/ml)에서 각각 배양한 신장 오가노이드의 성장 양상을 비교 관찰하였다.

[0102] 각 농도의 KEM 하이드로젤에서 모두 매트리지젤과 비슷한 양상을 보이며 오가노이드가 성장하였고 4일 동안 잘 배양되는 것을 확인하였다.

[0104] **탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)에서 장기 배양한 생쥐 신장 오가노이드 분석 (도 9)**

[0105] (A) 탈세포 KEM 하이드로젤과 매트리지젤에서 신장 오가노이드를 52일까지 장기 배양을 시도했을 때 9번의 계대배양을 진행하여도 두 지지체에서 모두 오가노이드가 유사한 구형의 모양과 크기를 잘 유지하며 배양되는 것을 확인하였다.

[0106] (B) 각각의 배양 지지체에서 52일 동안 9번의 계대배양을 진행한 신장 오가노이드의 Pax8 (renal progenitor cell) 과 Aqp1 (proximal tubule cell)의 mRNA 발현량을 비교해본 결과, 두 배양 지지체에서 Pax8은 비슷한 수준으로 발현되었고, Aqp1의 발현은 KEM 하이드로젤에서 더 높게 발현되었음을 확인하였다.

[0107] (C) 각각의 배양 지지체에서 9번의 계대배양을 진행한 오가노이드를 PAX8 (renal progenitor cell), Villin (proximal tubule cell), AQP3 (collecting duct cell), CALB1 (distal tubule cell) 항체를 사용하여 면역염색을 진행하였다. 면역염색 결과, 신장의 세뇨관을 구성하는 4종류의 세포들이 52일차까지도 이들 마커 발현을 잘 유지하면서 배양된다는 것을 확인하였고, cell-cell interaction에 관여하는 cytoskeleton 마커인 F-actin도 잘 발현되는 것을 확인하였다.

[0108] 이를 통해 KEM 하이드로젤에서 신장 오가노이드가 2달 이상으로 지속적인 장기 배양이 가능함을 입증하였고, 상용화된 오가노이드 배양 매트릭스인 매트리지젤과 비교하여 신장의 다양한 세포타입 마커들이 유사하거나

또는 그 이상의 수준으로 발현됨을 확인하였다.

- [0110] **탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)의 장기 보관 가능성 검증 (도 10, 11)**
- [0111] 먼저 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)의 장기 냉장 보관 가능성을 검증하였다 (도 10).
- [0112] (A) 탈세포 신장 조직 유래 KEM 용액 (농도 7 mg/ml)을 4 °C에서 최대 한 달 동안 냉장 보관하고, 이를 신장 오가노이드 배양에 이용하여 KEM 하이드로젤의 장기 보관 가능 여부와 안정성 여부를 확인하였다.
- [0113] (B) 배양 직전에 새로 제작한 KEM 용액으로 제작한 하이드로젤과 (Day 0), 일주일 (Day 7) 및 1개월 (Day 31) 동안 냉장 보관한 KEM 용액으로 제작한 하이드로젤 지지체 모두에서 매트릭셀과 비슷한 수준으로 신장 오가노이드 형성과 배양이 잘 되는 것을 확인하였다. (배양 12일차, 계대배양 1번 진행한 오가노이드 이미지) 계대배양 직후와 4일간 추가 배양한 이후 오가노이드 수를 각각 측정하고 이를 비율로 나타내어 오가노이드 형성 효율을 측정하였다.
- [0114] (C) 정량적 qPCR 분석을 진행하였을 때, KEM 하이드로젤 그룹에서 stemness와 연관된 *Pax8* 유전자는 매트릭셀 그룹과 비슷한 수준으로 발현이 되었다. 신장 특이적 마커인 *Aqp1* (proximal tubule cell)은 매트릭셀 그룹보다 KEM 하이드로젤 그룹에서 전반적으로 mRNA 발현양이 높게 관찰되었다. (배양 12일차, 계대배양 1번 진행한 오가노이드를 샘플로 분석 진행)
- [0115] (D) 오가노이드 면역염색 분석 결과, 신장 특이적 마커들인 AQP3 (collecting duct cell), CALB1 (distal tubule cell)과 PAX8 (renal progenitor cell)이 KEM 하이드로젤 조건에서도 매트릭셀에서와 유사한 수준으로 잘 발현됨을 확인하였다.
- [0116] 본 실험을 통해 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 용액을 액상으로 냉장 보관하여도 최소 한달까지 활성 및 기능에 영향 없이 장기 보관이 가능하다는 것을 확인하였다. 이는 제품 개발에 있어 중요한 KEM 하이드로젤의 장기 보관 가능성을 입증하는 결과이다.
- [0118] 그리고 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)의 장기 냉동 보관 가능성을 검증하였다 (도 11).
- [0119] (A) 탈세포 신장 조직 유래 KEM 용액 (농도 7 mg/ml)을 -80 °C에서 최대 3달 동안 냉동 보관하고, 이를 다시 녹여서 신장 오가노이드 배양에 이용함으로써 KEM의 장기 보관 가능 여부와 안정성 여부를 확인하였다.
- [0120] (B) 배양 직전에 새로 제작한 KEM 용액으로 제작한 하이드로젤과 (Day 0), 일주일 (Day 7) 및 3달 (Day 90) 동안 냉동보관한 KEM 용액으로 제작한 하이드로젤 배양 지지체 모두에서 매트릭셀과 비슷한 수준으로 신장 오가노이드의 형성과 배양이 잘 되는 것을 확인하였다. (배양 12일차, 계대배양 1번 진행한 오가노이드 이미지)
- [0121] (C) 정량적 qPCR 분석을 실시하였을 때, KEM 하이드로젤 그룹에서 stemness와 연관된 *Pax8* 유전자는 매트릭셀 그룹과 비슷한 수준으로 발현이 되었다. 또한 신장 특이적 마커인 *Aqp1* (proximal tubule cell)은 매트릭셀 그룹 보다 KEM 하이드로젤 그룹에서 mRNA 발현양이 높음을 확인하였다. (배양 12일차, 계대배양 1번 진행한 오가노이드를 샘플로 분석 진행)
- [0122] (D) 면역염색 분석 결과, 신장 특이적 마커인 AQP3 (collecting duct cell)이 KEM 하이드로젤 조건에서도 매트릭셀에서와 유사한 수준으로 잘 발현됨을 확인하였다.
- [0123] 본 실험을 통해 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 용액을 냉동 조건 (-80 °C)에서 얼려서 보관을 하여도 최소 3개월까지 활성 및 기능에 영향 없이 안정적으로 장기 보관이 가능하다는 것을 확인한 것이다.
- [0125] **신장 오가노이드 배양을 위한 탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)의 조직 특이적 효과 확인 (도 12)**
- [0126] 탈세포 신장 조직 유래 KEM 지지체에 함유된 신장 특이적인 세포외기질 성분들이 신장 오가노이드의 형성과 발



달에 미치는 조직 특이적인 효과를 입증하기 위해 다른 장기 유래 탈세포 지지체들에서도 신장 오가노이드를 배양한 후 비교 분석을 진행하였다.

- [0127] (A) 신장(KEM), 장(IEM), 근육(MEM), 피부(SkEM), 심장(HEM) 유래 탈세포 하이드로젤 지지체에 신장 오가노이드를 배양한 결과, 7일차에 피부와 심장 유래 탈세포 지지체에서는 신장 오가노이드가 제대로 형성되지 않은 것을 확인하였다. 또한, 계대배양을 한번 진행하고 4일동안 추가 배양한 경우에는(총 11일 배양) 탈세포 신장 조직 유래 지지체를 제외한 나머지 탈세포 조직 지지체들에서 모두 오가노이드 크기가 작게 형성된 것을 관찰했고, 심장 유래 지지체에서는 7일차와 동일하게 오가노이드가 형성되지 않은 것을 확인하였다.
- [0128] (B) 신장 오가노이드 형성 효율의 정량 분석 결과, 신장 유래의 탈세포 KEM 지지체에서 형성 효율이 가장 높았고 다른 장기 유래의 탈세포 지지체에서는 형성 효율이 유의미하게 감소함을 확인할 수 있었다. 계대배양 직후 및 추가 배양 4일 후에 오가노이드 수를 각각 측정한 후 이를 비율로 나타내어 형성 효율을 측정하였다.
- [0129] (C) 각 장기 유래 탈세포 하이드로젤 지지체에서 11일동안 배양된 신장 오가노이드의 마커 단백질 발현양을 비교하기 위해 세포 증식과 관련된 KI67 항체와 collecting duct cell과 연관 있는 AQP3 항체를 사용하여 면역염색을 진행하였다. KEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 신장 오가노이드의 경우 가장 뚜렷한 마커 발현을 보여주었고, 나머지 다른 조직 유래 지지체에서 배양된 오가노이드에서는 모두 상대적으로 미세한 발현만 관찰되거나 제대로 구조가 형성되지 못하였음을 확인할 수 있다.
- [0130] 본 실험을 통해 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤의 신장 오가노이드 형성과 발달에 미치는 조직 특이적 효과를 알 수 있다.
- [0132] **탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)에서 배양된 신장 오가노이드의 기능성 분석 (도 13)**
- [0133] 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤에서 배양한 신장 오가노이드가 생체 내 신장의 기능성을 잘 구현할 수 있는 여부를 확인하기 위한 분석을 진행하였다. 신장 오가노이드를 구성하는 여러 세포 타입들 중 하나인 근위 세뇨관 세포에 존재하는 P-glycoprotein (P-gp) xenobiotics efflux pump의 기능성을 확인하기 위해 P-gp 억제제인 verapamil을 처리한 후, calcein AM에 노출시켜 세포 내에 calcein AM의 축적 정도를 형광으로 확인하였다.
- [0134] (A) Verapamil을 처리하지 않은 조건에서는 P-gp가 calcein을 세포 밖으로 배출시켜 형광 신호가 오가노이드 내에 거의 축적되지 않음을 확인하였다 (No treatment 그룹). Verapamil 약물의 처리 농도가 높아질수록 calcein이 세포 내부에 축적되어 상대적으로 오가노이드 내에서 형광이 더 높게 발현되는 것을 확인하였다.
- [0135] (B) Verapamil 약물을 처리하지 않은 조건과 100  $\mu$ M verapamil을 처리한 조건에서 신장 오가노이드 내 calcein 형광 세기를 정량한 결과, verapamil을 처리한 조건에서 유의미하게 형광 세기가 증가한 것을 확인하였다.
- [0136] 이를 통해 KEM 하이드로젤에서 배양한 신장 오가노이드가 외부 물질을 배출하는 efflux pump 기능성을 보유하고 있음을 알 수 있다.
- [0138] **탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)에서 배양된 생쥐 신장 오가노이드를 이용한 신장 섬유증 모델 제작 (도 14)**
- [0139] KEM 하이드로젤에서 배양된 신장 오가노이드를 이용하여 신장 섬유증 질환 모델을 제작하였다. 이를 위해 마우스 신장 오가노이드에 TGF- $\beta$  약물을 처리하여 신장 섬유화를 유발하였다. 신장 오가노이드 배양 9일차에 (7일차에 계대배양 1번 진행 후, 2일 동안 추가적으로 배양) 각 농도별로 3일간 처리해주었고, 12일차에 분석을 진행하고, TGF- $\beta$ 를 처리하지 않은 신장 오가노이드 (NT, No treatment)를 대조군으로 비교하였다.
- [0140] (A) 신장 섬유증 모델을 제작하기 위해 TGF- $\beta$ 를 농도별로 처리한 결과, TGF- $\beta$ 를 처리하지 않은 신장 오가노이드는 잘 성장하였으나, TGF- $\beta$ 를 처리한 신장 오가노이드는 형태적 변이가 일어났고, 성장이 잘 일어나지 않음을 확인하였다.
- [0141] (B) 신장 섬유증 관련 마커인 *Acta2*와 *Col1a1*에 대한 qPCR 분석을 진행한 결과, 처리하는 TGF- $\beta$ 의 농도가 높아

질수록 섬유화 마커 mRNA의 발현이 비례적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0142] (C) 신장 섬유화 관련 마커인 Vimentin, COL1 (collagen type 1),  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin)의 발현을 면역염색을 통해 확인하였다. 7 mg/ml KEM에서 배양한 신장 오가노이드에 TGF- $\beta$ 를 처리하였을 때, KEM 하이드로젤이 수축하면서 섬유화가 유발된 오가노이드들이 한 덩어리로 합쳐지는 현상을 확인하였다. 면역염색 결과, TGF- $\beta$ 를 처리한 신장 오가노이드에서 모든 섬유화 마커들의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 매트릭셀과 KEM 지지체에서의 신장 오가노이드들이 모두 비슷한 섬유화 마커 발현 양상을 보이는 것을 확인하였다.

[0143] 본 실험을 통해 KEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 신장 오가노이드를 기반으로 신장 섬유증 질환 모델의 제작 가능성을 확인할 수 있다.

[0145] **탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 (Kidney Extracellular Matrix, KEM) 지지체의 생체적합성 확인 (도 15)**

[0146] 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체가 신장 오가노이드 이식용 소재로서 적합한지 확인하기 위해 탈세포 신장 조직 유래 5 mg/ml KEM 지지체를 마우스 피하조직에 이식한 후, 조직학 분석을 진행하였다. 이식된 KEM 하이드로젤 지지체 내로의 염증세포의 침윤 정도를 확인하기 위해 H&E 염색을 진행하였고, 면역반응으로 인해 발생한 비만세포 (mast cell)의 유무를 확인하기 위해 Toluidine blue 염색을 진행하였다. 분석 결과, KEM 하이드로젤을 이식한 부위에서 염증관련 세포들이 발견되지 않았음을 통해 KEM 하이드로젤 이식 시 생체 내에서 면역반응이나 염증반응은 거의 유발되지 않는다는 것을 확인하였다.

[0148] **탈세포 신장 조직 유래 세포외기질 지지체(Kidney Extracellular Matrix, KEM)를 이용한 신장 오가노이드 생체 내 이식 결과 (도 16, 17)**

[0149] 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤을 오가노이드 이식 소재로서 활용 가능한지 확인하기 위해 마우스 신장 신피막 (kidney capsule)에 KEM 하이드로젤을 이용하여 신장 오가노이드를 이식하였다. 이식한 세포들의 생착과 존재여부를 확인하기 위해 DiI 형광 dye로 표지된 신장 오가노이드를 사용하였고, 신장 조직 내로 이식 효율을 높이기 위한 하이드로젤 점도를 맞추기 위해 KEM 하이드로젤을 1:20 (v/v) (KEM : 배양액 조성) 비율로 혼합하여 생체 내로 이식하였다.

[0150] 생체 내로 이식한 신장 오가노이드의 생착 정도를 관찰하기 위해 이식 후 4일차에 신장 조직을 수득하여 조직학 분석을 진행하였다. 그 결과, 도 16에서 확인되는 바와 같이 신피막 안쪽에 형광 신호의 존재를 확인하였고, 따라서 이식된 오가노이드가 조직에 잘 생착된 것을 확인하였다.

[0152] 탈세포 신장 조직 유래 KEM 하이드로젤 지지체가 신장 오가노이드 이식용 소재로서 활용 가능한지 확인하기 위해 동물 실험과 조직학 분석을 진행하였다. 급성 신손상 (acute kidney injury, AKI) 모델을 유발하기 위해 10 mg/kg cisplatin 약물을 마우스 복강 내에 1회 주입하고 다음 날 이식 효율 및 생착을 증진시키기 위해 25  $\mu$ l의 7 mg/ml의 KEM 하이드로젤을 이용하여 600~700개의 신장 오가노이드를 마우스 신장 capsule에 이식하였다. 이식 14일차에 각 그룹 마우스의 신장 조직들을 수득하여 H&E 염색과 면역염색 분석을 진행하였다.

[0154] 그리고, 신장 손상 동물모델에서 신장 오가노이드의 생체 내 이식 가능성을 확인하였다 (도 17)

[0155] (A) H&E 염색 결과, 오가노이드가 이식되지 않은 손상된 신장 조직에서는 급성 신손상의 대표적인 양상인 급성 세뇨관 괴사(acute tubular necrosis, ATN)와 충혈 (hyperemic kidney) 부위가 광범위하게 관찰되었다. 이에 반해, KEM 지지체를 이용하여 신장 오가노이드를 이식한 경우에는 손상된 신장 조직의 피질 부위에 신장 오가노이드들이 잘 생착하였고 치료를 받지 않은 대조군 신장 조직보다 상대적으로 손상 부위가 크게 줄어든 것을 확인하였다. 또한, 급성 신손상의 증상 중 하나인 사구체 구조의 수축 정도를 확인하기 위해 사구체 면적 정량분석을 실시한 결과, 신장 오가노이드를 이식한 신장 조직의 경우 이식되지 않은 조직보다 덜 손상된 사구체 구조를 유지하고 있음을 확인하였다.

[0156] (B) 각 조건에서 급성 신손상의 주요 증상 중 하나인 근위 세뇨관의 세포사멸 정도를 확인하기 위해 근위 세뇨관 마커인 Villin에 대한 면역염색을 진행하였다. 그 결과, 오가노이드가 이식되지 않은 손상된 신장조직 보다



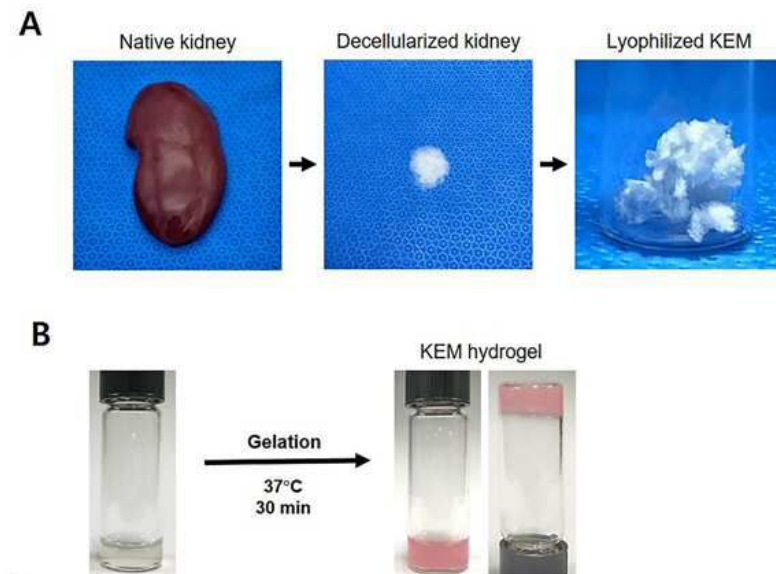
오가노이드를 이식한 신장 조직에서 근위 세뇨관의 비율이 유의미하게 높음을 확인하였고, 따라서 이식된 오가노이드가 손상 부위에 생착하여 근위세뇨관의 재생이 이루어짐을 확인하였다.

[0157] 본 실험을 통해 KEM 하이드로젤 지지체가 신장 질환 모델을 치료하기 위한 오가노이드 이식용 소재로서 활용될 수 있고, 손상된 조직 내 오가노이드의 생착 효율을 향상시키고 동시에 신장 구조 회복을 유도할 수 있음을 입증하였다.

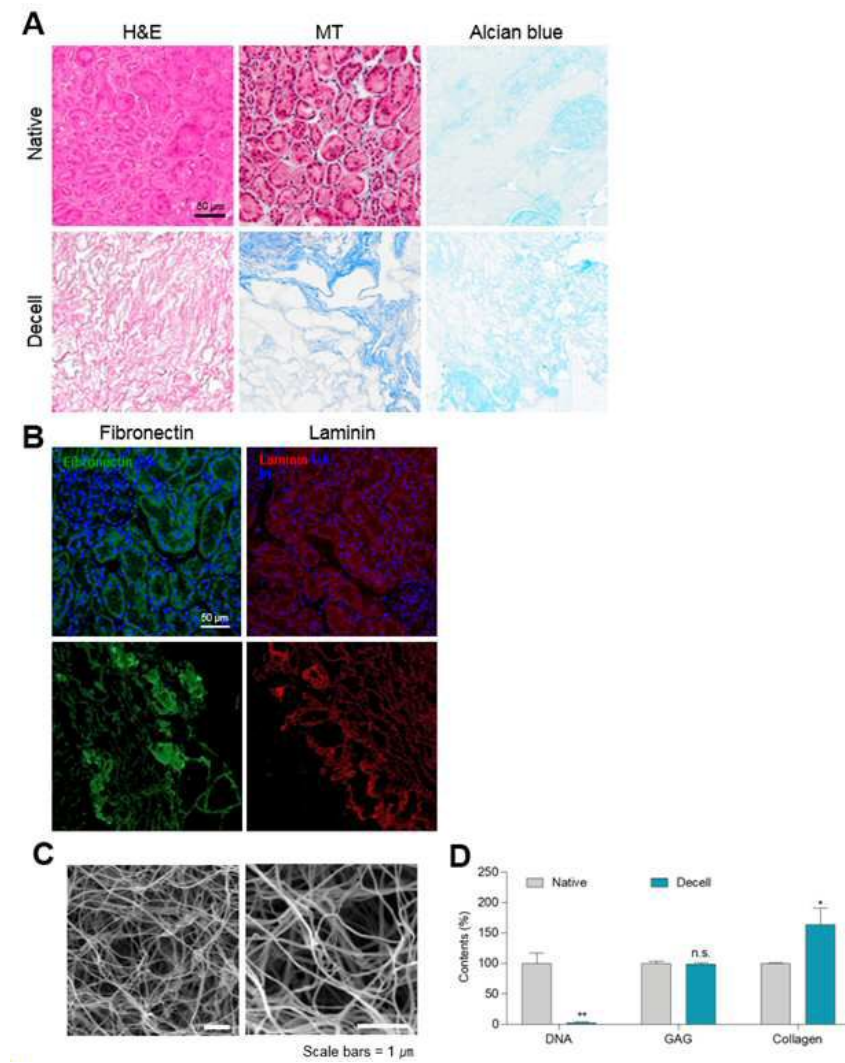
[0159] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

## 도면

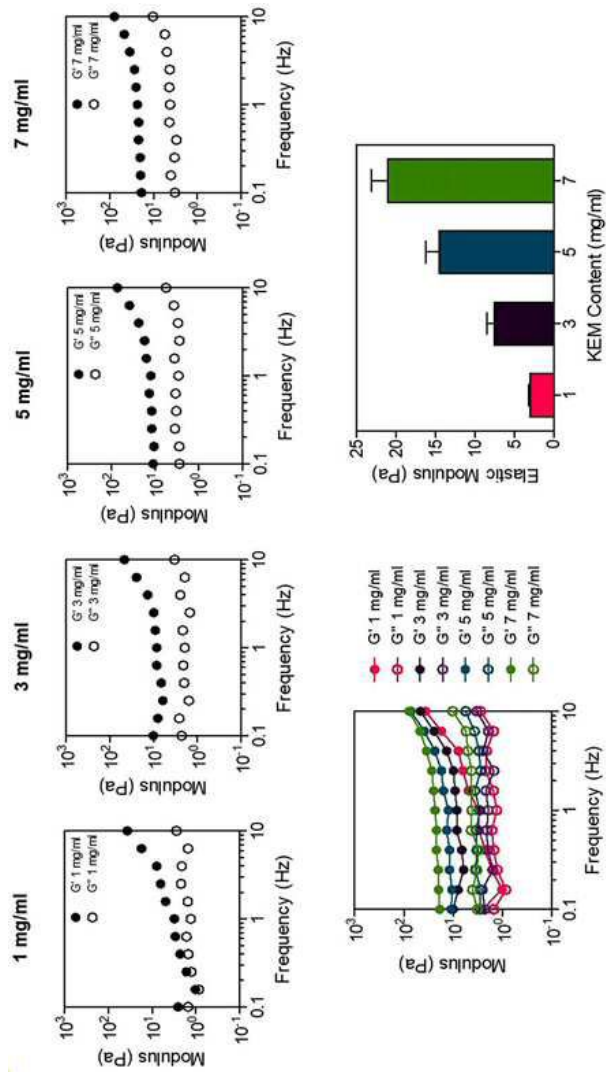
### 도면1



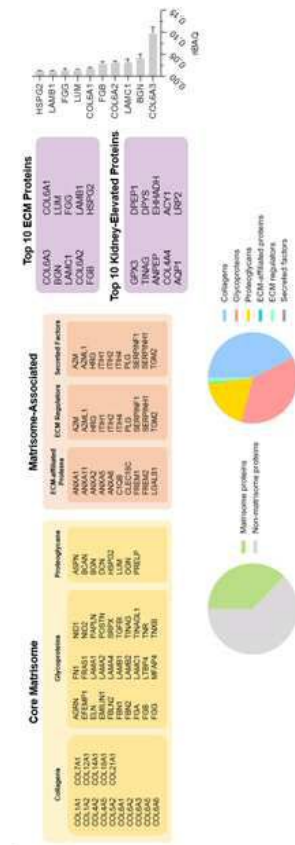
도면2



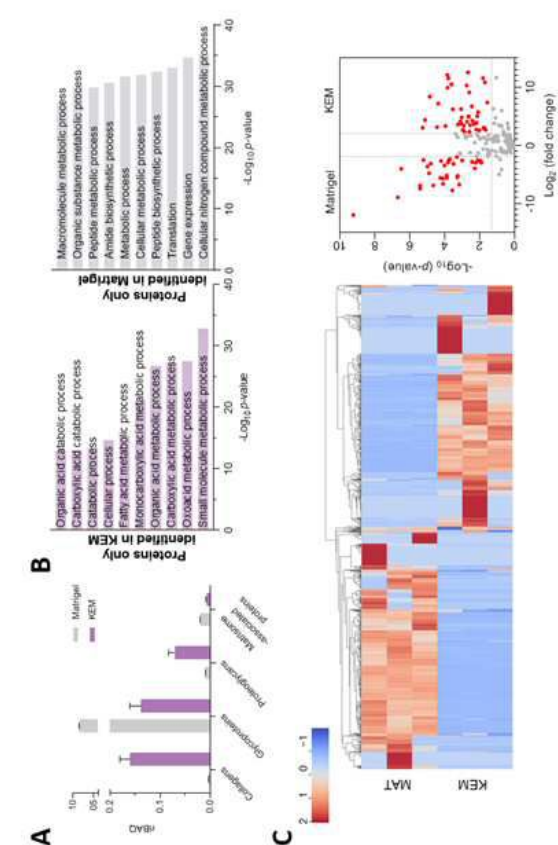
도면3



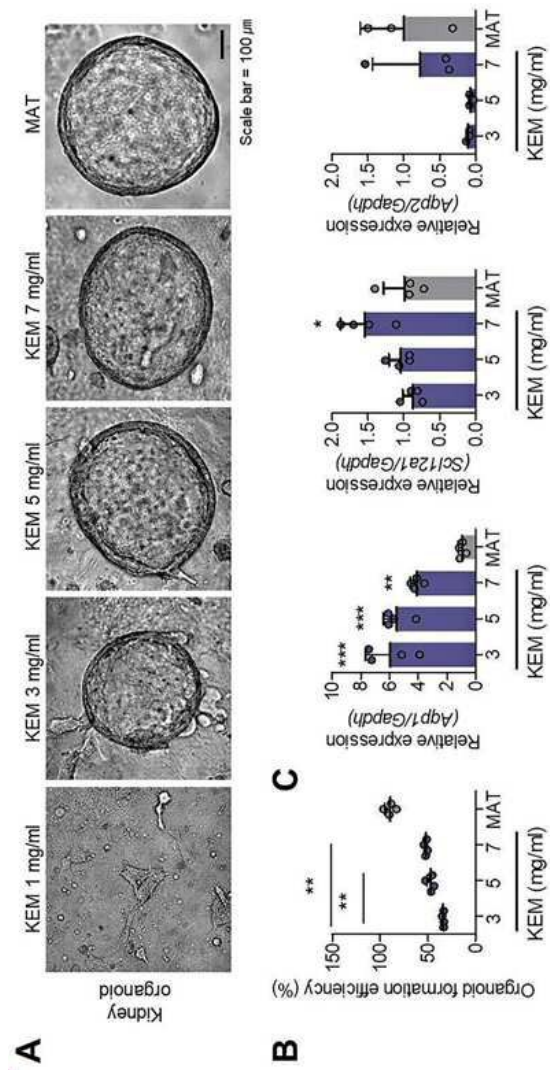
도면4



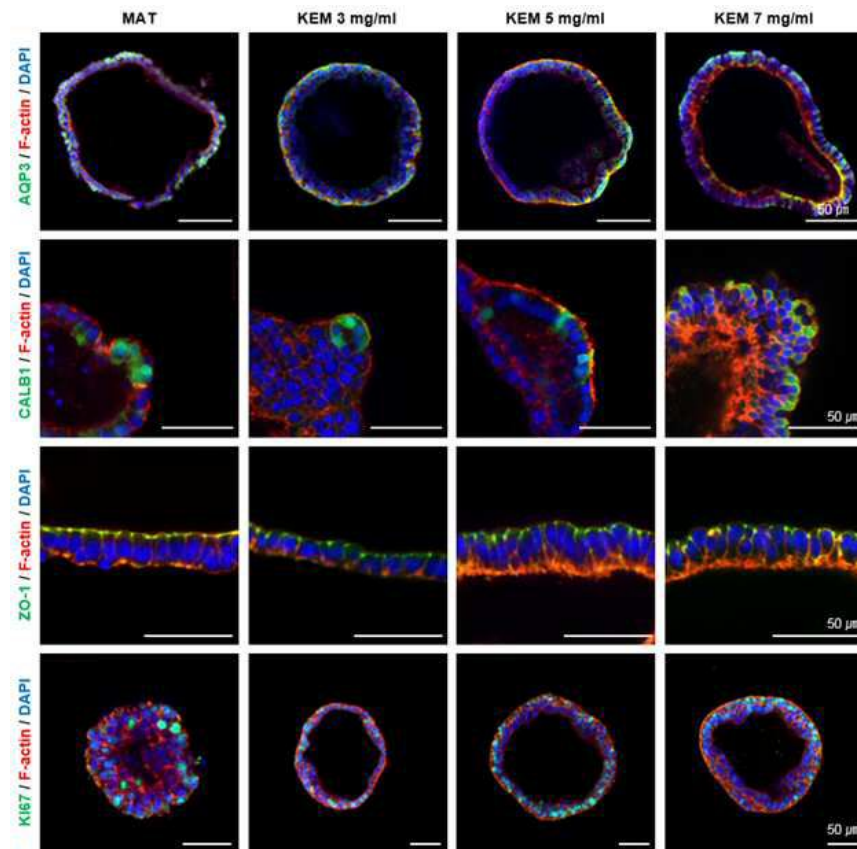
도면5



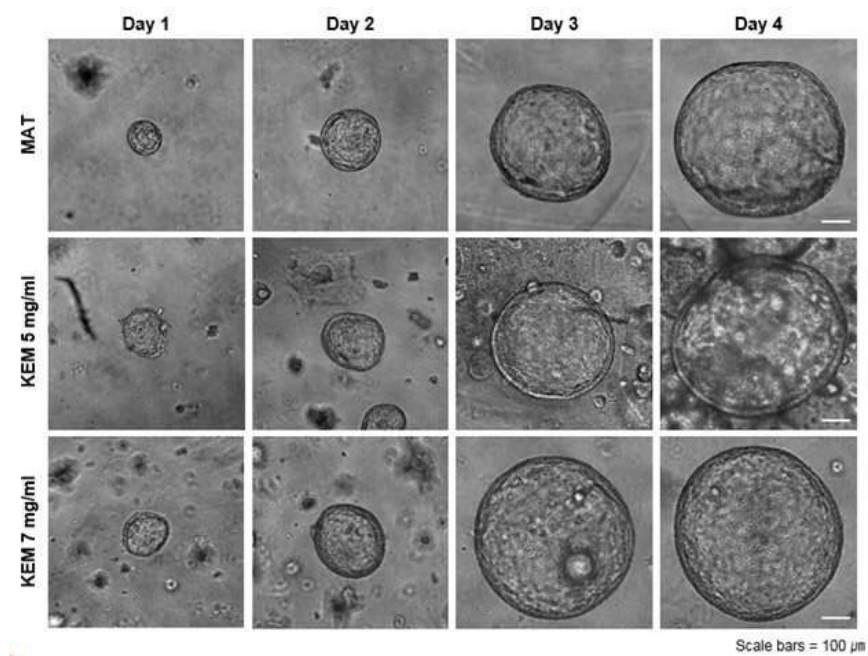
도면6



도면7

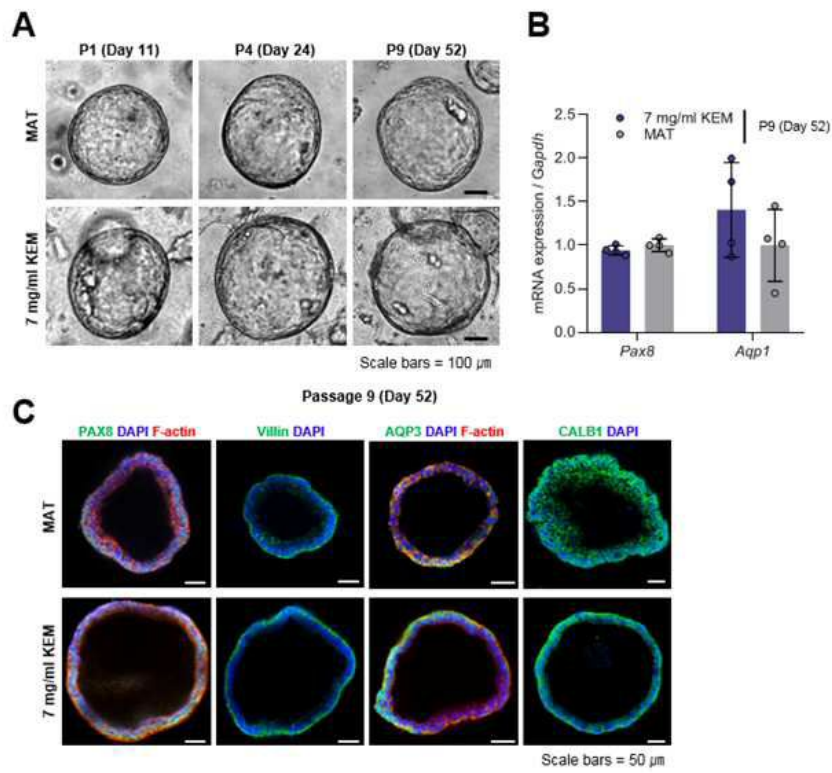


도면8

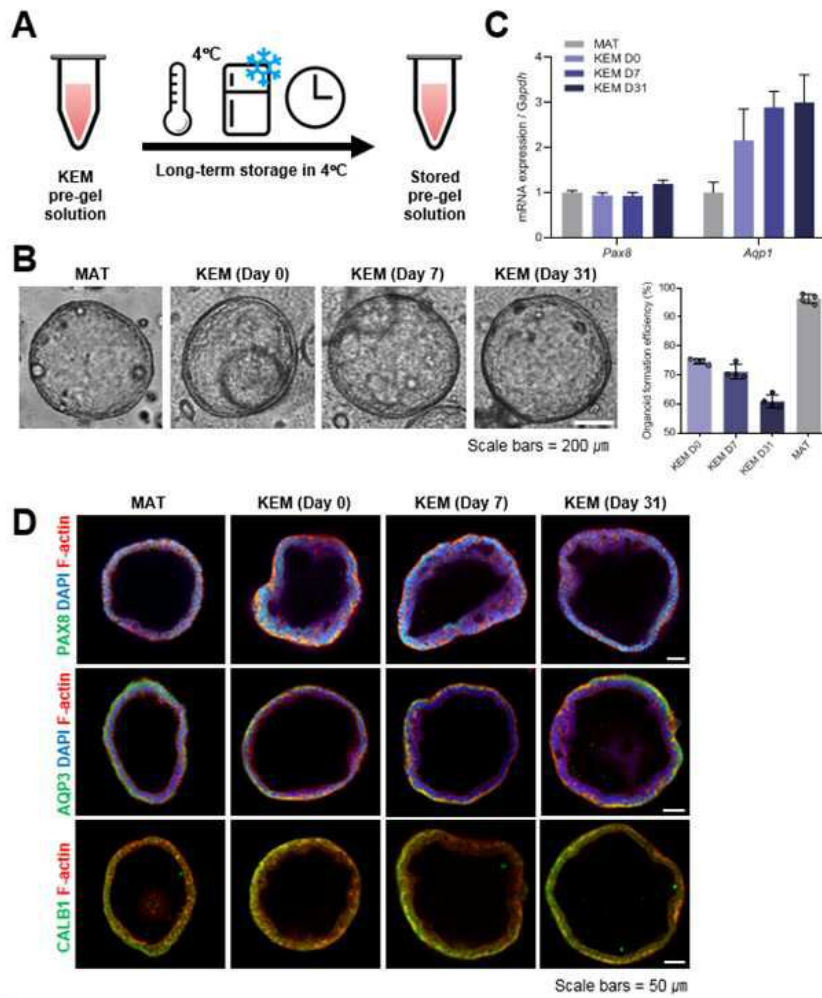




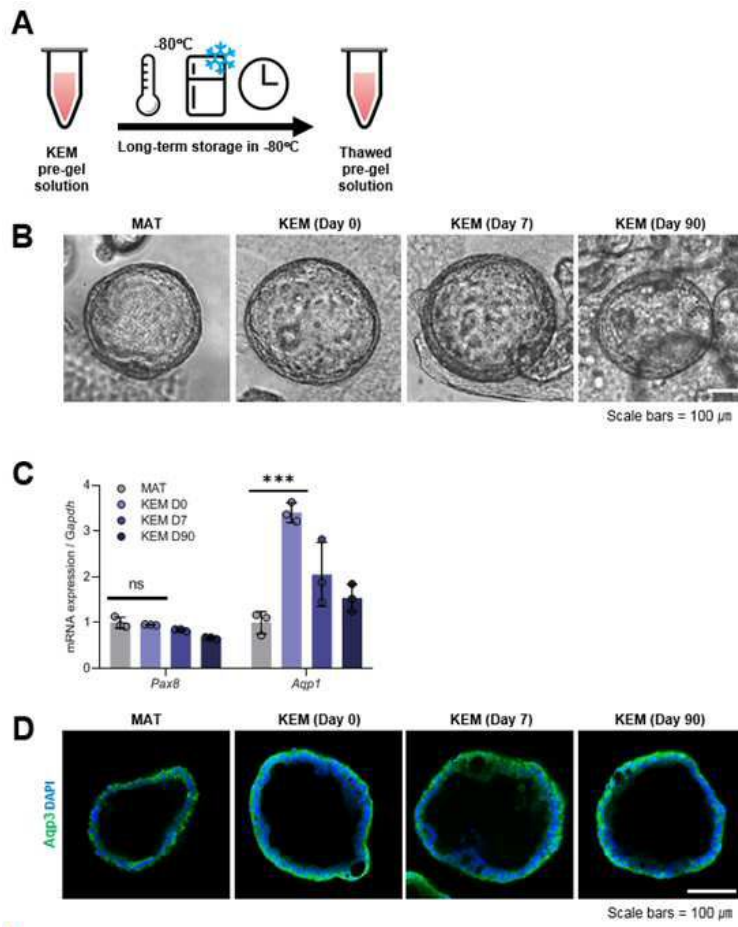
도면9



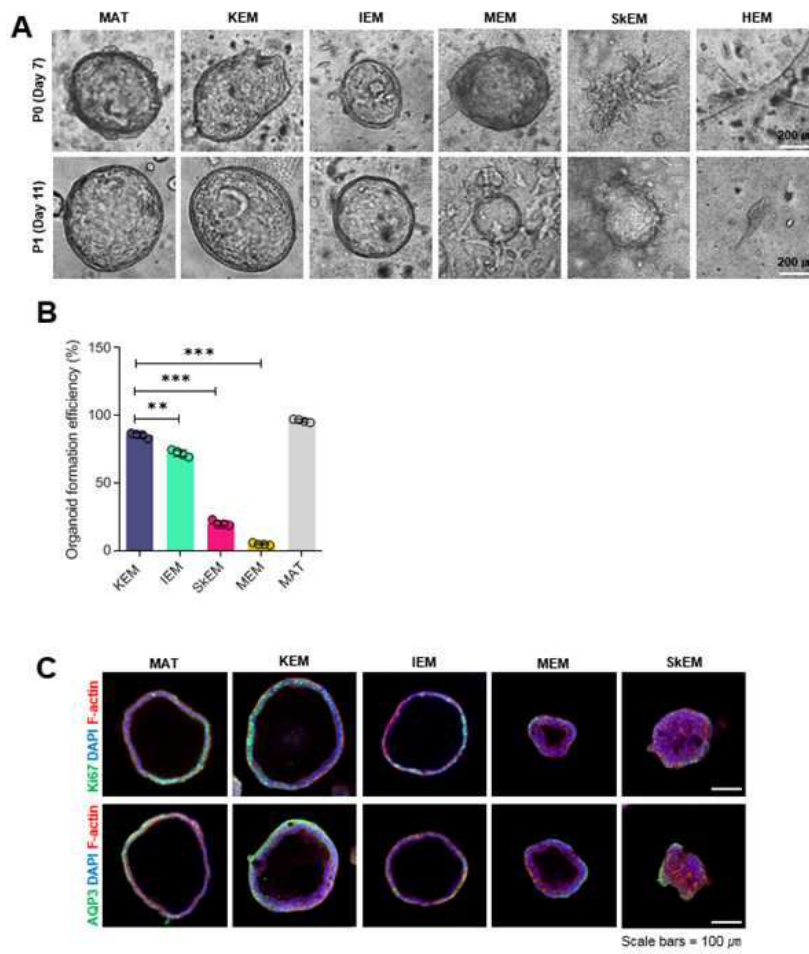
도면10



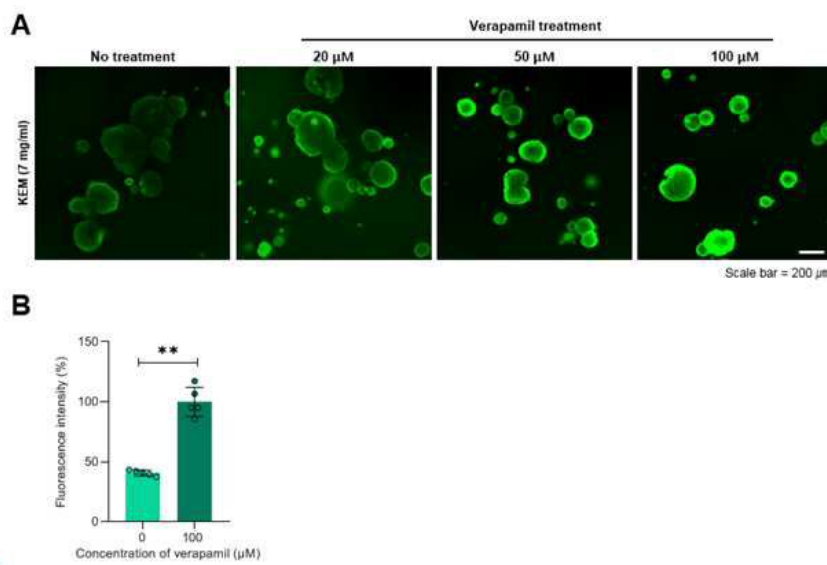
도면11



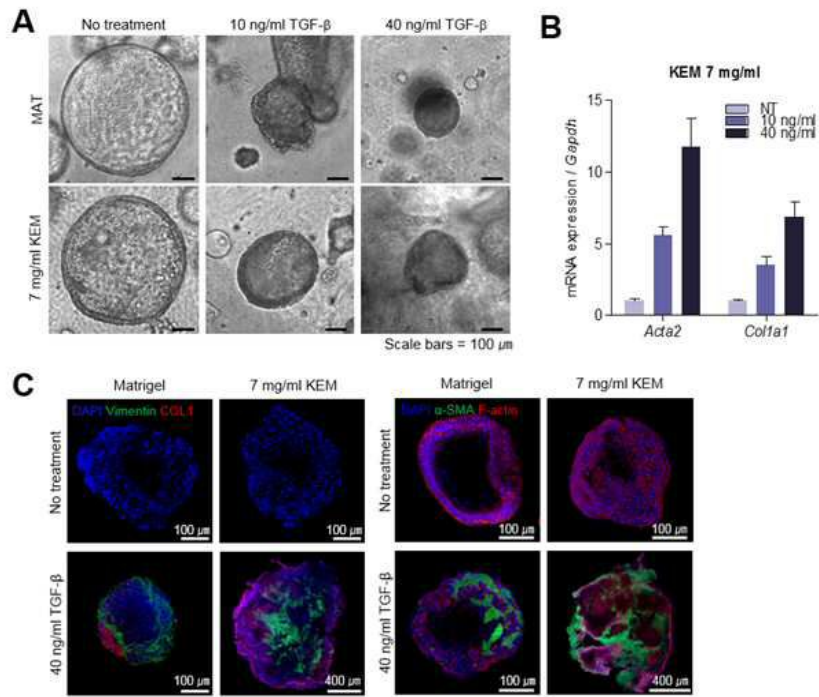
도면12



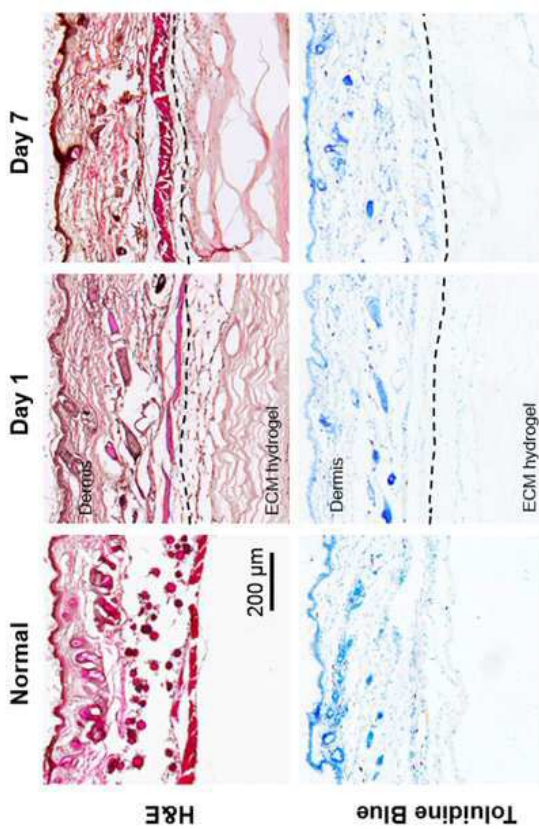
도면13



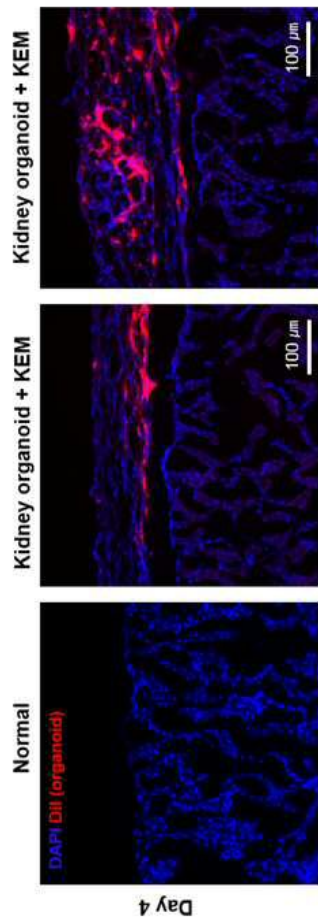
도면14



도면15



도면16





도면17

