



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0068172
(43) 공개일자 2022년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12M 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0679 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0157355
(22) 출원일자 2021년11월16일
심사청구일자 2021년11월16일
(30) 우선권주장
1020200153717 2020년11월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
조승우
서울특별시 서대문구 연세로50 연세대학교 공학원 347호
박세원
서울특별시 서대문구 연세로 50 제2공학관 533호
전은제
서울특별시 서대문구 연세로 50 제2공학관 525호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

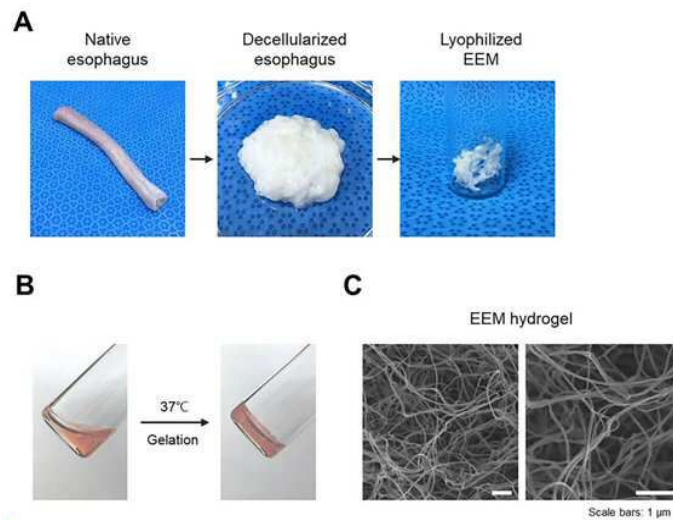
전체 청구항 수 : 총 8 항

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

(57) 요약

본 발명은 탈세포 식도 조직(Esophagus Extracellular Matrix; EEM)을 이용한 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

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

식도 조직 유래 세포외기질 (Esophagus Extracellular Matrix; EEM)을 포함하는 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식도 조직 유래 세포외기질은 식도 조직에 트립신/EDTA, Triton X-100 및 소듐 데옥시콜레이트를 처리하여 탈세포된 것인, 지지체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 지지체 내 상기 식도 조직 유래 세포외기질의 농도는 0.5 mg/ml 내지 10 mg/ml인, 지지체.

청구항 4

1) 분리된 식도 조직을 파쇄하는 단계; 및

2) 상기 파쇄된 식도 조직에 트립신/EDTA, Triton X-100 및 소듐 데옥시콜레이트를 처리하여 탈세포하여 탈세포된 식도 조직 유래 세포외기질 (EEM)을 제조하는 단계;

를 포함하는 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

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

청구항 6

제5항에 있어서,

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

청구항 7

제 6항에 있어서,

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

하이드로젤화 하는 것인 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법.

청구항 8

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

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[0003] 오가노이드는 삼차원 환경에서 특정 장기의 구조와 기능을 모사할 수 있어, 발생학 연구, 질환 모델링, 신약 개발, 약물 스크리닝, 세포 치료제 등 다양하게 의생명과학 분야에 응용될 수 있는 매우 유망한 체외 모델이다. 그 동안 보편적인 오가노이드의 배양 지지체로서 상용화된 매트리젤을 사용해 왔으나, 매트리젤은 쥐의 육종암에서 유래한 성분으로 동물성 병원체의 전이와 면역원으로서의 위험성을 가지고 있을 뿐 아니라 특정 조직 특이적인 미세환경을 제공할 수 없으며 매우 고가이기 때문에 이러한 매트리젤을 기반으로 한 오가노이드의 배양 시스템은 실용적 한계를 가진다. 따라서 매트리젤을 대체할 수 있는 다양한 종류의 하이드로젤 지지체 개발 연구들이 진행되어 왔으나, 아직까지 매트리젤을 대체할 수준의 소재는 없는 실정이다.

[0004] 탈세포화 기술은 조직으로부터 세포는 제거하여 면역 반응의 위험을 줄이고 다양한 세포외기질 성분은 보존함으로써 조직 특이적인 미세환경을 구현할 수 있어 조직공학 분야에서 기능성 지지체 제작을 위해 각광받는 기술이다. 그러나 탈세포 공정을 통해 제작된 식도 조직 특이적 세포외기질 기반 하이드로젤을 이용하여 식도 오가노이드를 배양하고 매트리젤에서 배양된 식도 오가노이드와의 동등성을 비교 분석하여 탈세포 매트릭스의 매트리젤 대체 가능성을 평가한 연구는 전무하다.

[0005] 본 발명에서는 탈세포 식도 조직 유래 세포외기질 기반 하이드로젤 지지체를 식도 오가노이드 배양에 적용하였을 때, 매트리젤과 유사한 수준으로 식도 오가노이드의 형성 및 유지가 가능함을 확인하였다. 특히, 매트리젤에서 배양된 식도 오가노이드와 비교하여 식도 조직 특이적 마커들의 발현이 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤에서 배양된 식도 오가노이드에서 크게 향상되었다. 즉 개발된 탈세포 지지체가 식도 오가노이드에 최적화된 식도 조직 특이적인 미세환경을 제공할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 낮은 비용으로 대량 제작이 가능한 탈세포 기술의 장점을 바탕으로 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체는 종래 매트리젤 기반 오가노이드 기술의 한계를 극복할 수 있는 새로운 식도 오가노이드 배양 플랫폼으로 개발될 수 있을 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR10-2021-0069619A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 돼지 식도 조직을 화학적 처리하여 대량의 탈세포 조직을 얻고 이를 기반으로 하이드로젤 지지체를 제작하여 식도 오가노이드 배양에 적용하기 위한 것이다.

[0009] 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

- [0011] 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.
- [0012] 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.
- [0013] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0014] 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 실험 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.
- [0016] 본 발명의 일 양상은 식도 조직 유래 세포외기질 (Esophagus Extracellular Matrix; EEM)을 포함하는 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체를 제공한다.
- [0017] 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.
- [0018] 상기 세포외기질은 콜라겐(collagens), 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코사아미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸(proteoglycans), 항균제(antimicrobials), 화학유인물질(chemoattractants), 시토카인 (cytokines), 및 성장 인자에 제한되지 않는, 구조형 및 비구조형 생체 분자(biomolecules)의 혼합물일 수 있다.
- [0019] 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.
- [0020] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예로 상기 식도 세포외기질은 식도 조직에 트립신/EDTA, Triton X-100 및 소듐 데옥시콜레이트를 처리하여 탈세포된 것일 수 있다. 이러한 처리를 통해 상기 식도 세포외기질은 탈세포 된 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예로 상기 지지체 내 상기 식도 세포외기질의 농도는 0.5 mg/ml 내지 10 mg/ml, 구체적으로는 1 mg/ml 내지 7 mg/ml 일 수 있다. 상기 식도 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/ml일 수 있다. 상기 범위의외의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없다.
- [0023] 상기 지지체는 탈세포화하여 수득한 식도 조직 유래 세포외기질을 기반으로 제조한 3차원 하이드로젤을 포함하며, 식도 오가노이드 배양에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0024] 상기 탈세포화된 식도 조직은 실제 조직 특이적 세포외기질 성분을 포함하므로 해당 조직의 물리적, 기계적, 생화학적 환경을 제공할 수 있으며, 식도 조직 세포로의 분화 및 조직 특이적 기능성을 증진시키는데 매우 효율적이다.
- [0025] 상기 “오가노이드(organoid)”는 조직 또는 전분화능 줄기세포에서 유래된 세포를 3D 형태로 배양하여 인공장

기와 같은 형태로 제작한 초소형 생체기관을 의미한다.

- [0026] 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.
- [0027] 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.
- [0029] 본 발명의 다른 일 양상은 1) 분리된 식도 조직을 파쇄하는 단계; 및 2) 상기 파쇄된 식도 조직에 트립신/EDTA, Triton X-100 및 소듐 데옥시콜레이트를 처리하여 탈세포하여 탈세포된 식도 세포외기질 (EEM)을 제조하는 단계를 포함하는 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체 제조방법을 제공한다.
- [0030] 상기 1) 단계는 분리된 식도 조직을 파쇄하는 단계로, 상기 식도 조직은 공지의 동물에서 분리된 것일 수 있고, 상기 동물의 구체적인 예시로, 소, 돼지, 원숭이, 인간 등일 수 있다. 또한 본 발명에서는 상기 분리된 식도 조직을 파쇄한 뒤 탈세포 처리하기 때문에 탈세포의 효율이 높다. 분리된 식도 조직을 파쇄하는 방법은 공지의 방법으로 이루어질 수 있다.
- [0031] 상기 2) 단계는 상기 파쇄된 식도 조직에 트립신/EDTA, Triton X-100 및 소듐 데옥시콜레이트를 처리하여 탈세포하여 탈세포된 식도 조직 유래 세포외기질 (EEM)을 제조하는 단계이다. 본 발명은 기존의 탈세포 방식과 달리 DNA 분해효소 (DNase)를 처리하지 않고도 대부분의 세포를 효율적으로 제거할 수 있다. 상기 탈세포는 공지의 공정으로 이루어질 수 있고, 구체적인 예시로 파쇄된 식도 조직을 트립신/EDTA, Triton X-100 및 소듐 데옥시콜레이트와 함께 교반하면서 탈세포 공정이 이루어질 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예로 상기 2)단계 이후 3) 상기 탈세포 식도 조직 유래 세포외기질 (EEM)을 동결건조 하여 동결건조 식도 조직 유래 세포외기질을 제조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 3) 단계는 상기 탈세포 식도 조직 유래 세포외기질 (EEM)을 동결건조 하여 동결건조 식도 조직 유래 세포외기질을 제조하는 단계이다. 상기 동결건조 식도 조직 유래 세포외기질은 멸균을 위해 건조 후 전자 빔, 감마 방사선, 에틸렌 옥사이드 가스 또는 초임계 이산화탄소에 노출시킬 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예로 상기 3)단계 이후 4) 상기 동결건조 식도 조직 유래 세포외기질을 하이드로젤 형태의 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체로 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 4) 단계는 상기 동결건조 식도 조직 유래 세포외기질을 하이드로젤 형태의 식도 오가노이드 배양 및 이식용 지지체로 형성하는 단계이다. 상기 단계는 젤화 (gelation)를 통해 이루어질 수 있으며, 탈세포 식도 조직 유래 세포외기질을 가교시켜 3차원 하이드로젤 형태의 지지체를 제작할 수 있고, 젤화된 지지체는 실험, 스크리닝 뿐만 아니라 오가노이드 배양과 관련된 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 상기 젤화는 동결건조 식도 조직 유래 세포외기질을 산성 용액에서 펩신 또는 트립신과 같은 단백질 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.
- [0039] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 지지체 또는 상기 제조방법에 의해 제조된 지지체에서 식도 오가노이드를 배양하는 방법을 제공한다.
- [0040] 기존의 매트릭셀 기반 배양 시스템은 동물 암조직 유래의 추출물로서 배치 간의 차이가 크고 실제 식도의 환경을 모사해주지 못하고, 식도 오가노이드로 분화, 발달되는 효율이 미흡한 반면, 상기 지지체는 식도 조직 유사 환경을 조성할 수 있으므로 식도 오가노이드 배양에 있어서 적합하다.

[0041] 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.

[0042] 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

[0044] 본 발명에서 개발한 탈세포 식도 조직 유래 지지체는 기존의 오가노이드 배양 표준 지지체인 매트리젤이 가지고 있는 여러가지 한계를 극복함과 동시에 매트리젤과 유사한 수준의 식도 오가노이드를 제작할 수 있는 새로운 플랫폼으로서 적용되어 식도의 체외모델 구축 뿐 아니라 식도 오가노이드를 이용한 관련 질환 모델링, 신약 스크리닝, 조직 재생을 위한 이식 치료 등 여러 의생명과학 분야에 활용되어 기초학문과 의료 산업에 크게 이바지할 것으로 기대된다.

[0045] 식생활의 서구화 및 노령화 등 각종 병인으로 인해 국내에서도 소화기 관련 질환의 유병률이 크게 급증하고 있다. 국내뿐만 아니라 전 세계적으로도 인스턴트 식품 섭취의 증가, 불규칙한 식생활 등 현대사회에 접어들어 나타나는 식품 섭취 양상으로 인해 소화기 질환의 발병이 증가하는 추세이다. 소화기 질환 중 특히 식도와 관련된 다양한 질환들은 발병하면 만성화 되기 쉬우며 치료가 어려워 평생 고통을 수반하여 환자의 삶의 질을 크게 저하시키며 더 악화되면 식도 협착이나 암으로 진행이 되는 등 현대사회에서 급증하는 난치성 질환이다. 이렇듯 현대인의 삶의 질에 막대한 영향을 미치는 식도와 관련된 질환들(위식도 역류질환, 바렛 식도, 식도선암 등)을 체외에서 구현하고 그 기전을 밝히는 질환 모델링 연구와 신약 개발의 필요성을 고려하면, 본 발명에서 제작된 탈세포 식도 조직 유래 매트릭스는 식도 오가노이드 생산 플랫폼으로서 고부가가치 창출이 가능할 것으로 기대된다.

[0046] 특히, 비교적 간단한 화학적 공정을 통해 동물 식도 조직(예; 돼지)로부터 대량 생산이 가능하여 상업화 가능성이 매우 높으며, 기존의 매트리젤과 비교하여 비용적인 측면에서도 매우 큰 장점을 가지고 있어 막대한 경제적 이익 창출이 가능할 것이다. 식도 오가노이드 배양용 소재로서뿐만 아니라 식도 오가노이드를 재생의학적 목적으로 적용할 때 식도 오가노이드의 생체 내 생착 및 유지를 증진시키는 오가노이드 이식용 소재로서도 활용될 수 있어 그 적용 범위를 확장할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 탈세포 식도 조직 유래 지지체 제작 및 하이드로젤 미세구조 분석을 나타낸 것이다.

도 2는 탈세포 식도 조직 유래 지지체의 성분 분석을 나타낸 것이다.

도 3은 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 농도에 따른 물성 분석을 나타낸 것이다.

도 4는 탈세포 식도 조직 유래 지지체의 단백질 분석을 나타낸 것이다.

도 5는 탈세포 식도 조직 유래 지지체와 매트리젤의 단백질 성분을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 탈세포 식도 조직 유래 지지체의 배치(batch) 간 유사성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 식도 오가노이드 배양에 최적화된 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 농도 결정을 나타낸 것이다.

도 8은 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 배양한 식도 오가노이드의 성장 양상을 확인한 것이다.

도 9은 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 배양한 식도 오가노이드의 유전자 및 단백질 발현 분석을 나타낸 것이다.

도 10은 식도 오가노이드 배양을 위한 탈세포 식도 조직 유래 지지체의 조직 특이적 효과를 확인한 것이다.

도 11은 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 장기간 냉장 보관 가능성을 검증한 것이다.

도 12는 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 장기간 냉동 보관 가능성을 검증한 것이다.

도 13는 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 식도 오가노이드의 장기 배양을 확인한 것이다.

도 14 내지 16은 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤을 이용한 식도 오가노이드 생체 내 이식 및 재생 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 본 발명에서는 일련의 화학적 처리를 통해 식도 조직에서 효과적으로 세포를 제거하여 탈세포 식도 조직 유래 세포외기질 지지체를 제작하고, 이로부터 삼차원 하이드로젤을 제작하여 식도 오가노이드의 배양 매트릭스로 사용하여 배양하였다.
- [0050] 본 발명에서 제작한 탈세포 식도 유래 지지체에는 세포는 대부분 제거된 반면, 다양한 식도 조직 특이적 세포의 기질 성분은 잘 보존되어 있는 것을 확인하였다. 따라서 제작된 지지체는 식도 오가노이드 배양에 필요한 조직 특이적 미세환경을 제공할 수 있는 매트릭스로 활용될 수 있다.
- [0051] 제작한 탈세포 식도 조직 유래 세포외기질 하이드로젤 지지체에서 실제로 식도 오가노이드가 형성되는 것을 확인하였고, 하이드로젤 지지체를 여러 농도 조건에서 테스트하여 식도 오가노이드의 형성 및 발달에 최적화된 세포외기질 농도를 확인하였다.
- [0052] 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체와 대조군인 매트릭스에서 배양된 식도 오가노이드가 유사한 형태와 성장 양상을 보였으며 식도를 구성하는 기저층과 기저상층이 모두 존재하는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명에서 개발한 탈세포 지지체가 식도 오가노이드 배양에 있어 매트릭스를 대체할 수 있는 배양 매트릭스로서의 가능성을 가지고 있음을 검증하였다.
- [0053] 탈세포된 식도, 위, 간, 심장, 피부 조직 유래의 하이드로젤 지지체에서 각각 식도 오가노이드를 배양하여 조직 특이적 세포외기질의 영향을 비교하였다. 오가노이드의 형성 효율과 식도 조직을 구성하는 2종류의 세포층 발현을 복합적으로 고려하였을 때, 다른 조직 유래의 지지체에 비해 식도 조직 유래의 지지체가 식도 오가노이드의 배양에 가장 적합함을 확인하였다. 이를 통하여 탈세포 식도 조직 유래 세포외기질 지지체가 식도 오가노이드에 가장 적합한 조직 특이적인 미세환경을 제공할 수 있음을 확인하였다.
- [0054] 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체를 냉장 조건에서 장기간 보관한 뒤, 이를 이용하여 식도 오가노이드를 배양하였을 때, 새롭게 제작한 하이드로젤 지지체와 유사한 수준으로 식도 오가노이드가 형성되고 2종류의 식도 조직 세포층 마커가 모두 발현되는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명에서 개발된 지지체의 장기간 보관 가능성 및 안정성을 확인하였으며 따라서 추후 제품화에 매우 유리할 것으로 기대한다.
- [0055] 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체를 냉동 조건에서 장기간 보관한 뒤, 이를 해동하여 제작한 하이드로젤에서 식도 오가노이드를 배양하였을 때, 새롭게 제작한 하이드로젤 지지체와 유사한 수준으로 식도 오가노이드가 형성되고 2종류의 식도 조직 세포층 마커가 모두 발현되는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명에서 개발된 지지체를 최소 3달까지 보관하여도 활성 및 성능에 변화가 없음을 확인하였으며 따라서 추후 제품화에 매우 유리할 것으로 기대한다.
- [0056] 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 여러 번 계대 배양을 진행하며 장기간 식도 오가노이드를 배양하였을 때도 유사한 형태로 식도 오가노이드가 형성되며, 2종류의 식도 조직 세포층 마커의 발현을 대조군인 매트릭스와 비교하였을 때 비슷하거나 높은 발현을 보이는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명에서 개발한 지지체에서 식도 오가노이드의 장기간 배양이 가능함을 확인하였다.
- [0057] 식도가 손상된 마우스 모델에 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체를 이용하여 식도 오가노이드를 이식하였을 때, 식도의 상피 주위에 오가노이드가 정착되었으며, 손상된 상피의 재생에 효과적임을 확인하였다.
- [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] 탈세포 식도 조직 유래 지지체 제작 및 하이드로젤 미세구조 분석(도 1)

[0061] 탈세포화 처리를 통해 돼지 식도 조직에서 세포를 제거하고, 식도 세포외기질 기반 지지체(Esophagus Extracellular Matrix; EEM)를 제작하였다. 본 발명에서 사용한 탈세포 공정은 식도 조직을 잘게 자른 후 탈세포

포화 처리를 하였기 때문에 더 효과적으로 세포를 제거할 수 있고, 기존에 보고된 방식들과 다르게 DNA 분해효소(DNase)를 처리하지 않고도 대부분의 세포를 효율적으로 제거하였다.

[0062] (A) 돼지 식도 조직(Native esophagus)에 Trypsin/EDTA, Triton X-100, sodium deoxycholate를 기반으로 한 일련의 화학적 처리를 통해 세포를 효과적으로 제거하고 파쇄한 후(Decellularized esophagus), 이를 동결건조하여 식도 세포외기질을 수득하였다(Lyophilized EEM).

[0063] (B) 동결건조된 형태의 EEM 10 mg에 4 mg/ml 농도의 펩신 용액 (돼지 위 점막 유래 펩신 파우더 4 mg을 0.02 M HCl 1 ml에 녹인 용액) 1 ml을 처리하여 48 시간 동안 상온에서 교반하여 용액화 과정을 진행하였다. 제작한 EEM 용액에 10X PBS와 NaOH를 첨가하여 세포 배양에 적합한 pH와 전해질 농도로 맞춘 후 37°C 온도 조건에서 30 분 동안 하이드로젤 형성(Gelation)을 유도하였다. 이 과정을 통해 고형의 하이드로젤(오른쪽)을 제작하였으며, 이를 오가노이드 배양을 위한 3차원 지지체로 사용하였다.

[0064] (C) 3차원 EEM 하이드로젤 내부 미세 구조를 주사 전자 현미경(Scanning electron microscope; SEM)을 이용해 확인하였다. EEM 하이드로젤이 콜라겐(Collagen) 하이드로젤과 유사한 나노 섬유 기반의 다공성 구조로 이루어져 있음을 관찰하였다.

[0066] 탈세포 식도 조직 유래 지지체의 성분 분석(도 2)

[0067] (A) 탈세포 과정 전 (Native)과 후 (Decellularized) 돼지 식도 조직의 DNA, Glycosaminoglycan (GAG), Collagen을 정량 분석하여 비교하였다. 그 결과 탈세포 과정을 통해 96.37%의 세포가 효과적으로 제거됨을 확인하였고, 세포외기질 (Extracellular matrix)을 구성하는 주요 성분인 GAG와 Collagen 성분은 잘 유지됨을 확인하였다.

[0068] (B) 탈세포 과정 전 (Native)과 후 (Decellularized) 돼지 식도 조직에 대한 조직학 분석을 진행하였다. 그 결과, 헤마톡실린 & 에오신 염색 (H&E staining)을 진행하여 탈세포 과정 이후 세포는 모두 제거되고 세포외기질 성분은 보존됨을 확인하였고, 마손 삼색 염색 (Masson's trichrome)을 진행하여 Collagen 성분이 탈세포 과정 후에도 잘 유지됨을 확인하였다. 또한, 알시안 블루 염색 (Alcian blue)을 통해 GAG 성분이 잘 보존됨을 확인하였다.

[0070] 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 농도에 따른 물성 분석(도 3)

[0071] 유변학 분석(Rheological analysis)을 통해 4가지 농도 조건(1, 3, 5, 7 mg/ml)의 EEM 하이드로젤과 상용화된 배양 지지체인 매트릭셀(Matrigel; MAT)의 물성(Elastic modulus)을 측정하여 비교하였다. 매트릭셀과 마찬가지로 EEM 하이드로젤이 모든 농도 조건에서 storage modulus(G') 값이 loss modulus(G'') 값보다 일관되게 높은 값을 유지함을 확인함으로써 EEM 하이드로젤 내부에 안정적인 고분자 네트워크가 형성됨을 확인하였다. 또한, EEM의 농도가 증가할 수록 하이드로젤의 물성이 증가하며, 전체적으로 매트릭셀보다 낮은 물성을 가지는 것을 확인하였다.

[0073] 탈세포 식도 조직 유래 지지체의 단백질 분석(도 4)

[0074] 질량분석법 (Mass spectrometry)을 이용하여 EEM의 단백질 분석 (Proteomics)을 진행하였다.

[0075] (A) EEM을 구성하는 단백질 중 세포외기질 단백질 (Matrisome proteins)이 56.93%를 차지하며, 세포외기질 단백질 중 특히 프로테오글리칸 (Proteoglycans), 콜라겐 (Collagens), 당단백질 (Glycoproteins)이 대부분을 구성하는 것을 확인하였다.

[0076] (B) EEM을 구성하는 주요 세포외기질 단백질인 프로테오글리칸, 콜라겐, 당단백질에 속하는 각 단백질 성분을 확인하였다.

[0077] (C) riBAQ (relative intensity-based absolute quantification) 값을 기반으로 각 단백질 성분을 정량하고, EEM 내의 세포외기질 단백질 중 가장 많은 비중을 차지하는 10가지 단백질 성분을 확인하였다.

[0078] 이를 통해 식도 조직 세포외기질 단백질 복합 성분이 주성분으로 구성된 EEM 지지체가 식도 오가노이드의 배양

에 적합한 세포외기질 미세환경을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

[0080] **탈세포 식도 조직 유래 지지체와 매트릭셀의 단백질 성분 비교 (도 5)**

- [0081] (A) EEM과 매트릭셀에 모두 존재하는 단백질 성분에 대하여 히트맵 (heatmap)을 이용해 발현량의 차이를 비교하였다. 이를 통해 두 지지체를 구성하는 단백질 성분의 조성에 큰 차이가 있음을 확인하였다.
- [0082] (B) EEM과 매트릭셀이 차이를 보이는 단백질 성분을 분석하고자 각 지지체에서만 검출된 단백질에 대해 Gene Ontology Enrichment Analysis를 진행하여 가장 연관된 10가지 biological process를 p-value에 따라 통계적으로 확인하였다. 주로 세포 대사 과정과 연관된 매트릭셀과 달리, EEM의 경우 extracellular matrix/structure organization 및 cytoskeleton organization과 주로 관련되어 있는 것을 확인하였다.
- [0083] (C) 두 지지체를 구성하는 단백질 성분을 비교한 결과, 매트릭셀 보다 EEM에서 더 다양한 종류의 세포외기질 단백질 (Matrisome proteins)이 검출되었고, 식도에서 발현된다고 알려진 단백질 (Esophagus-expressed proteins)도 EEM에서 더 많은 종류가 검출되었다. 또한, 다른 조직보다 식도에서 4배 이상 발현되는 것으로 알려진 단백질 (Esophagus-elevated proteins)의 경우 매트릭셀에서는 전혀 검출되지 않았고 EEM에서만 14종류가 검출되었다.
- [0084] (D) 매트릭셀에서는 검출되지 않았으나 EEM에서는 검출된 Esophagus-elevated proteins에 대하여 Gene Ontology Enrichment Analysis를 진행하였고, 이들 단백질들이 상피세포의 증식과 연관성이 있음을 확인하였다.
- [0085] 이를 통해 EEM이 상용화된 오가노이드 배양 지지체인 매트릭셀 보다 더 다양한 세포외기질 성분을 제공할 수 있는 지지체이며 특히 식도 특이적인 미세환경을 조성할 수 있음을 확인하였고, 이러한 식도 특이적인 미세환경이 식도 오가노이드를 구성하는 상피세포의 발달에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

[0087] **탈세포 식도 조직 유래 지지체의 배치 (batch) 간 유사성 확인 (도 6)**

- [0088] 서로 다른 돼지로부터 제작한 EEM을 구성하는 단백질 성분을 비교하여 배치 (batch) 간 유사성을 확인하였다.
- [0089] (A) riBAQ 값을 기반으로 단백질 성분을 정량하여 3가지 배치의 EEM 각각을 구성하는 core matrisome 단백질 중 가장 많은 비중을 차지하는 10가지 성분을 비교하였고 배치 간에 상당히 유사한 양상을 보이는 것을 확인하였다. (세 배치에서 모두 공통된 성분은 붉은 글씨로 표시함)
- [0090] (B) 3가지 배치의 EEM과 매트릭셀을 구성하는 세포외기질 단백질에 대하여 PCA (principal component analysis) 분석을 통해 유사도를 확인하였다. 매트릭셀과 비교하여 상대적으로 EEM 배치 간에 세포외기질 단백질 발현의 유사도가 높음을 확인하였다.
- [0091] 이러한 EEM 배치 간 단백질 성분의 유사성을 고려하였을 때, 서로 다른 배치의 EEM을 사용하여도 식도 세포외기질 미세환경의 반복적인 구현이 가능할 것으로 생각된다.

[0093] **식도 오가노이드 배양에 최적화된 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 농도 결정(도 7)**

- [0094] 마우스 식도 조직의 근육층을 제거한 뒤 효소 처리 과정을 통해 세포를 추출하고 이를 적합한 3차원 배양 지지체 내에서 배양하면 식도 오가노이드가 형성된다. 본 발명에서 개발한 EEM 하이드로젤 지지체의 식도 오가노이드 배양에 최적화된 농도를 선정하고자, 농도 별(1, 3, 5, 7 mg/ml) EEM 하이드로젤 및 상용화된 배양 지지체인 매트릭셀에서 식도 오가노이드를 배양하여 형성된 식도 오가노이드의 형태와 형성 효율 및 유전자 발현을 비교하였다.
- [0095] (A) 4가지 농도 조건의 EEM 하이드로젤에서 모두 식도 오가노이드가 형성되었으며, 매트릭셀에서 배양한 식도 오가노이드와 비슷한 형태로 형성되는 것을 확인하였다.
- [0096] (B) EEM 하이드로젤의 농도 별로 오가노이드의 형성 효율(organoid formation efficiency)을 매트릭셀과 비교하였다. 전체적으로 매트릭셀보다 낮은 형성 효율을 보이나, 5, 7 mg/ml의 EEM 하이드로젤에서 다른 농도에 비해 높은 형성 효율을 보이는 것을 확인하였다.
- [0097] (C) 4가지 농도 조건의 EEM 하이드로젤과 매트릭셀에서 배양된 식도 오가노이드의 특정 유전자에 대한 mRNA 발

현양을 정량적 PCR(quantitative PCR)로 비교하였다. 식도의 기저층(Basal layer)에 발현되는 유전자인 *Krt14*가 모든 농도 조건의 EEM에서 발현이 증가하였고(왼쪽), 기저상층(Suprabasal layer)에 발현되는 유전자인 *Krt13*이 3, 5, 7 mg/ml의 EEM에서 발현이 증가하였다(오른쪽). 기저층과 기저상층에 각각 발현되는 유전자 모두 EEM에서 대체적으로 발현이 증가함을 확인하였고, 특히 5 mg/ml EEM 그룹의 경우 매트리젤 그룹과 비교하였을 때 식도 조직 마커 발현이 증가하는 정도가 가장 유의미함을 확인하였다. 이를 통해 추후 식도 오가노이드의 배양을 위한 EEM 최적 농도는 5 mg/ml 조건으로 정하고 이후 EEM 하이드로젤 배양에 적용하였다.

[0099] **탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 배양한 식도 오가노이드의 성장 양상 확인(도 8)**

[0100] 5 mg/ml의 EEM 하이드로젤과 매트리젤에서 배양한 식도 오가노이드의 성장 양상을 배양 시작 후 3, 6, 9일 차(Day 3, 6, 9)에 확인하였다. EEM 하이드로젤에서 배양한 식도 오가노이드가 매트리젤에서와 비슷한 성장 속도를 보이며 크기가 증가하는 것을 확인하였다.

[0102] **탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 배양한 식도 오가노이드의 유전자 및 단백질 발현 분석(도 9)**

[0103] (A) 5 mg/ml의 EEM 하이드로젤과 매트리젤에서 배양한 식도 오가노이드의 유전자 발현을 정량적 PCR을 통해 비교하였다. 기저층에서 발현되는 유전자인 *Sox2*와 *Krt14*의 발현을 비교해 보았을 때, *Sox2*의 발현은 크게 차이 나지 않으나 *Krt14*의 발현이 EEM 하이드로젤 그룹에서 유의미하게 증가하였다(왼쪽). 또한 기저상층에서 발현되는 유전자인 *Krt13*과 *Krt4*의 발현을 비교해 보았을 때, 두 유전자 모두 매트리젤 그룹과 비교하여 EEM 하이드로젤 그룹에서 유의미하게 발현이 증가하였다(오른쪽).

[0104] (B) 5 mg/ml의 EEM 하이드로젤과 매트리젤에서 배양한 식도 오가노이드의 단백질 발현을 면역 형광염색을 통해 비교하였다. 기저층에서 발현되는 단백질인 Cytokeratin 14(CK14), p63이 두 그룹에서 모두 오가노이드의 가장 겉부분에 유사한 형태로 발현되었고, 기저상층에서 발현되는 단백질인 Cytokeratin 13(CK13)도 두 그룹에서 비슷한 수준으로 발현되는 것을 확인하였다. 세포골격(Cytoskeleton)을 이루는 주요 단백질인 F-actin과 상피세포(Epithelial cell) 간의 접합 부위에서 발현되는 단백질인 E-cadherin (ECAD)의 발현 양상을 통해 매트리젤과 마찬가지로 EEM 하이드로젤에서 상피세포가 인접한 구 형태의 식도 오가노이드가 형성됨을 확인하였다. 또한 세포의 증식과 관련된 단백질인 Ki-67이 비슷한 수준으로 발현됨을 확인하였다.

[0105] 이를 통해 EEM 하이드로젤이 기존의 상용화된 오가노이드 배양 지지체인 매트리젤과 비슷한 수준으로 식도 오가노이드를 형성할 수 있는 지지체임을 확인하였다.

[0107] **식도 오가노이드 배양을 위한 탈세포 식도 조직 유래 지지체의 조직 특이적 효과 확인(도 10)**

[0108] 탈세포 식도 조직에서 유래한 EEM 하이드로젤 지지체가 식도 오가노이드 배양에 있어 조직 특이적인 미세환경을 제공하는 것을 확인하고자, 탈세포화된 다른 조직 유래의 하이드로젤 지지체에서 식도 오가노이드를 배양하고 오가노이드의 형성과 유전자 발현을 EEM 하이드로젤 지지체와 비교하였다. 다른 지지체로 위(SEM), 간(LEM), 심장(HEM), 피부(SkEM) 조직을 탈세포하여 사용하였다.

[0109] (A) 탈세포화된 위, 간, 피부 조직 유래의 지지체에서는 식도 오가노이드가 형성되었으며, 탈세포화된 심장 조직 유래의 지지체에서는 형성되지 않은 것을 확인하였다.

[0110] (B) 각 지지체에서의 오가노이드 형성 효율을 비교한 결과, 다른 조직 유래의 지지체에서 모두 형성 효율이 크게 감소함을 확인하였다.

[0111] (C) 식도 오가노이드의 형성 효율이 매우 낮아 mRNA 추출이 불가능한 LEM, HEM 그룹을 제외하고 위, 피부 조직 유래의 지지체에서 배양한 식도 오가노이드의 유전자 발현을 정량적 PCR을 통해 식도 유래 지지체에서 배양한 오가노이드와 비교하였다. 기저층에서 발현되는 유전자인 *Sox2*의 발현이 위, 피부 조직 유래의 지지체에서 배양한 식도 오가노이드에서 모두 유의미하게 감소하였으며, 특히 피부 조직 유래의 지지체에서 배양한 식도 오가노이드에서는 기저상층에서 발현되는 유전자인 *Irf1*의 발현 또한 유의미하게 감소한 것을 확인하였다.

[0112] 본 실험을 통해 식도가 아닌 다른 조직 유래의 하이드로젤 지지체와 비교했을 때 EEM 하이드로젤 지지체에서 식도 오가노이드의 형성 및 발달이 가장 잘 되는 것을 확인하였고, 결과적으로 EEM 하이드로젤 지지체가 식도 조

직 특이적인 미세환경을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[0114] **탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 장기간 냉장 보관 가능성 검증(도 11)**

[0115] (A) 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤의 pre-gel 용액을 4℃ 냉장 조건에서 장기간 보관하고, 이를 이용해 하이드로젤을 제작하여 식도 오가노이드를 배양하고 결과를 비교함으로써 EEM 지지체의 장기간 냉장 보관 가능성을 검증하였다.

[0116] (B) 배양 직전에 제작한 EEM 하이드로젤, 4℃에서 1주일, 1달 간 보관했던 pre-gel 용액으로 제작한 EEM 하이드로젤에서 모두 매트리젤과 유사한 형태로 식도 오가노이드가 형성되는 것을 확인하였다.

[0117] (C) 배양 직전에 제작한 EEM 하이드로젤, 4℃에서 1주일, 1달 간 보관했던 pre-gel 용액으로 제작한 EEM 하이드로젤과 매트리젤에서 배양한 식도 오가노이드의 유전자 발현을 정량적 PCR을 통해 비교하였다. 기저층에서 발현되는 유전자인 *Krt14*와 기저상층에서 발현되는 유전자인 *Krt13*, *Krt4*의 발현이 매트리젤 그룹과 비교하여 모든 EEM 하이드로젤 그룹에서 유의미하게 증가하였다.

[0118] 본 실험을 통해 EEM 하이드로젤이 pre-gel 용액 상태로 냉장 조건에서 1달까지 보관하여도 식도 오가노이드의 배양 지지체로서 성능에 변화가 없음을 확인하였다. 이와 같은 우수한 보관성은 개발된 지지체의 제품화를 고려하였을 때 매우 유리한 장점이다.

[0120] **탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체의 장기간 냉동 보관 가능성 검증 (도 12)**

[0121] (A) 탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤의 pre-gel 용액을 -80℃ 냉동 조건에서 장기간 보관하고, 이를 해동해서 하이드로젤을 제작하여 식도 오가노이드를 배양하고 결과를 비교함으로써 EEM 지지체의 장기간 냉동 보관 가능성을 검증하였다.

[0122] (B) 배양 직전에 새로 준비한 EEM 용액으로 제작한 하이드로젤, -80℃에서 1달, 2달, 3달 간 보관했던 pre-gel 용액으로 제작한 EEM 하이드로젤에서 모두 매트리젤과 유사하게 식도 오가노이드가 잘 형성되는 것을 확인하였다.

[0123] (C) 배양 직전에 새로 제작한 EEM 하이드로젤, -80℃에서 1달, 2달, 3달 간 보관했던 pre-gel 용액으로 제작한 EEM 하이드로젤과 매트리젤에서 배양한 식도 오가노이드의 유전자 발현을 정량적 PCR을 통해 비교하였다. 기저층에서 발현되는 유전자인 *Krt14*와 기저상층에서 발현되는 유전자인 *Krt13*, *Krt4*의 발현이 매트리젤 그룹과 비교하여 EEM 하이드로젤 그룹에서 유지되거나 유의미하게 증가하는 양상을 보이며 냉동 조건에서 보관한 하이드로젤에서 배양한 오가노이드 그룹에서도 동일한 양상을 확인하였다.

[0124] 본 실험을 통해 EEM 하이드로젤이 pre-gel 용액 상태로 냉동 조건에서 최소 3달까지 보관하여도 식도 오가노이드의 배양 지지체로서 활성 및 성능에 변화가 없음을 확인하였다. 이와 같은 우수한 보관성은 개발된 지지체의 제품화를 고려하였을 때 매우 유리한 장점이다.

[0126] **탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 식도 오가노이드의 장기 배양 (도 13)**

[0127] (A) EEM 하이드로젤에서 3회 계대 배양 진행하며 총 45일 간 식도 오가노이드를 배양하여 계대 배양이 가능함을 확인하였다. 45일 간 배양하였을 때도 매트리젤에서 배양한 경우와 유사한 형태로 식도 오가노이드가 형성되었다.

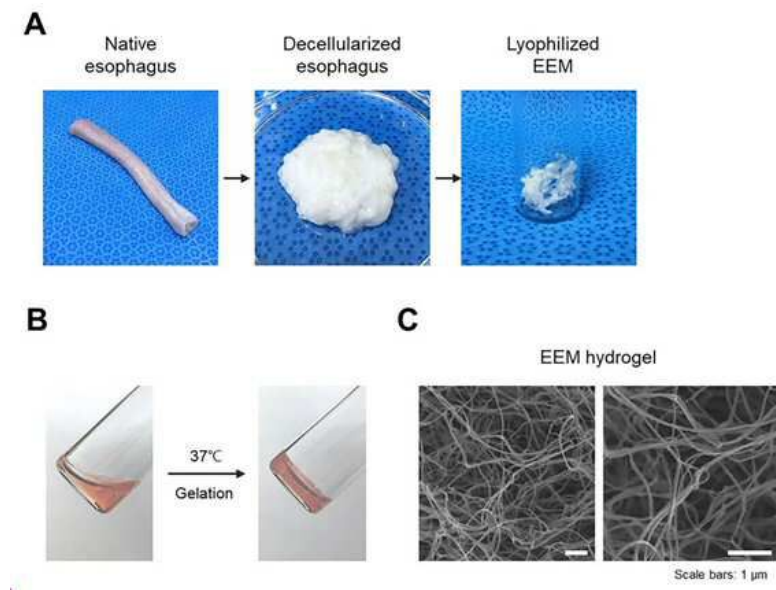
[0128] (B) 12일 간 배양했을 때 (P0)와 45일 간 배양했을 때 (P3), EEM 하이드로젤과 매트리젤에서 배양한 식도 오가노이드의 유전자 발현을 정량적 PCR을 통해 비교하였다. 그 결과 기저층에서 발현되는 유전자인 *Krt14*와 기저상층에서 발현되는 유전자인 *Krt13*의 발현을 비교해 보았을 때, 두 유전자 모두 매트리젤 그룹과 비교하여 EEM 하이드로젤 그룹에서 비슷하게 유지되거나 유의미하게 발현이 증가하였고, 계대 배양하며 45일 간 배양한 경우도 동일한 결과를 보였다.

[0129] 이를 통해 EEM 하이드로젤에서 식도 오가노이드의 장기간 배양이 가능하며, 여러 번 계대 배양 진행 후에도 매트리젤과 비교하였을 때 유사하거나 향상된 식도 특이적 유전자 발현 양상을 보이는 것을 확인하였다.

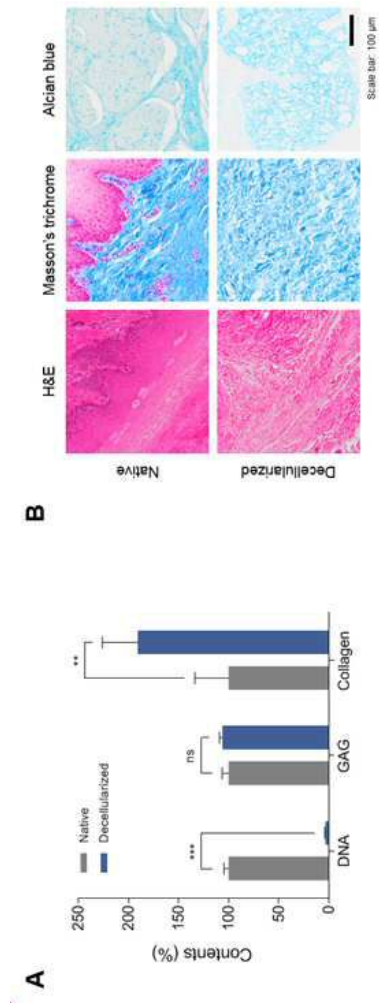
- [0131] **탈세포 식도 조직 유래 하이드로젤을 이용한 식도 오가노이드 생체 내 이식 및 재생 효과 확인 (도 14 내지 16)**
- [0132] 50%의 아세트산을 capillary tube를 이용해 식도 외벽에 30초 간 처리하여 궤양을 유발한 식도 손상 마우스 모델에 EEM에서 배양한 식도 오가노이드를 5 mg/ml의 EEM 하이드로젤을 사용하여 손상 직후에 점막하층(submucosa)에 주입하였고, 이 때 오가노이드의 생착을 확인하고자 DiI로 표지한 식도 오가노이드를 사용하였다. 본 실험에서 마우스 당 약 1000개의 식도 오가노이드를 20 μ l의 EEM pre-gel 용액을 사용하여 이식하였다. 또한, 손상을 유발하지 않은 그룹 (Sham), 손상 유발 후 saline을 주사한 그룹 (Saline), 손상 유발 후 식도 오가노이드를 EEM 하이드로젤을 사용해 이식한 그룹 (Esophageal organoid + EEM; EO + EEM) 간의 비교를 통해 재생 효과를 확인하였다.
- [0133] (A) 손상 유발 이후 마우스의 몸무게를 측정한 결과, 초반에는 Saline 그룹과 EO + EEM 그룹에서 모두 몸무게가 감소하였다가 시간이 지날수록 회복하는 양상을 보였으나 특히 2일차와 3일차에 EO + EEM 그룹이 Saline 그룹과 비교하여 몸무게 회복 정도에서 유의미한 차이를 보였다.
- [0134] (B) 이식 후 1일, 3일, 10일차에 EO + EEM 그룹의 조직을 수거하여 DiI-labeled 식도 오가노이드의 생착을 확인하였다. 식도 상피(epithelium)의 아래 부분에 오가노이드가 위치하는 것을 확인하였으며 특히 오가노이드가 안정적으로 생착되어 10일차까지도 오가노이드가 같은 위치에 존재하였다.
- [0135] (C, D) 이식 후 1일, 3일, 10일차에 조직을 수거하여 식도 조직층의 형태적 변화를 관찰하기 위해 H&E 염색을 진행하였다. Sham 그룹과 비교하여, Saline 그룹과 EO + EEM 그룹에서 점막(mucosa)의 상피(epithelium) 손상이 관찰되었고 시간이 지나면서 손상 부위의 길이(검은색 점선으로 표기된 부분)가 짧아지며 재상피화(re-epithelialization) 되는 양상을 보였다. H&E 염색을 통해 관찰한 상피 손상 부위의 길이를 측정하여 비교하였고, 1일차와 3일차에 Saline 그룹과 비교하여 EO + EEM 그룹에서 손상 부위의 회복 정도가 유의미한 차이를 보였다.
- [0136] (E, F) 이식 후 10일차에 수거된 조직을 마손 삼색 염색(Masson's trichrome staining) 진행하여 식도 상피(epithelium)와 근육층(muscularis externa) 사이 IEL(inner esophageal layer)에 축적된 Collagen을 바탕으로 Fibrosis 정도를 비교하였다. Sham 그룹과 비교하여, Saline 그룹과 EO + EEM 그룹에서 손상 후 Fibrosis가 유발되었으나 EO + EEM 그룹에서 그 정도가 감소하였다.
- [0137] (G, H) 이식 후 10일차 조직을 식도의 기저층에서 발현되는 Cytokeratin 5 (CK5)로 면역염색 진행하여 비교하였다. CK5가 발현되는 층의 두께가 Saline 그룹보다 EO + EEM 그룹에서 유의미하게 증가하였고, 이를 바탕으로 EEM 하이드로젤을 이용해 식도 오가노이드를 이식한 경우 손상되었던 식도 상피의 재생이 촉진되는 것을 확인하였다.
- [0138] 이를 통해 EEM 하이드로젤을 이용하여 식도 오가노이드의 이식 및 생착이 가능할 뿐만 아니라 손상된 식도 상피의 재생과 Fibrosis 감소에 효과적임을 확인하였다.
- [0140] 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

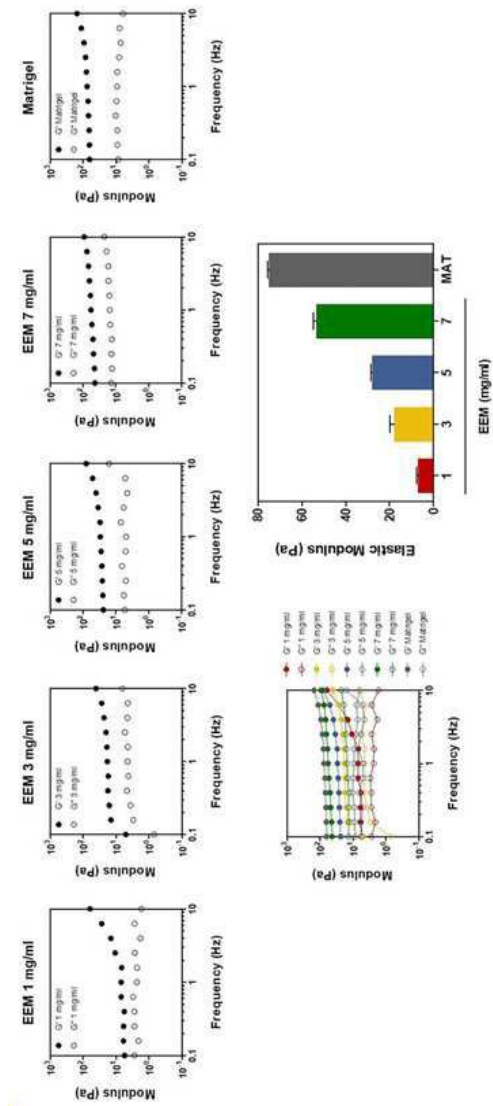
도면1



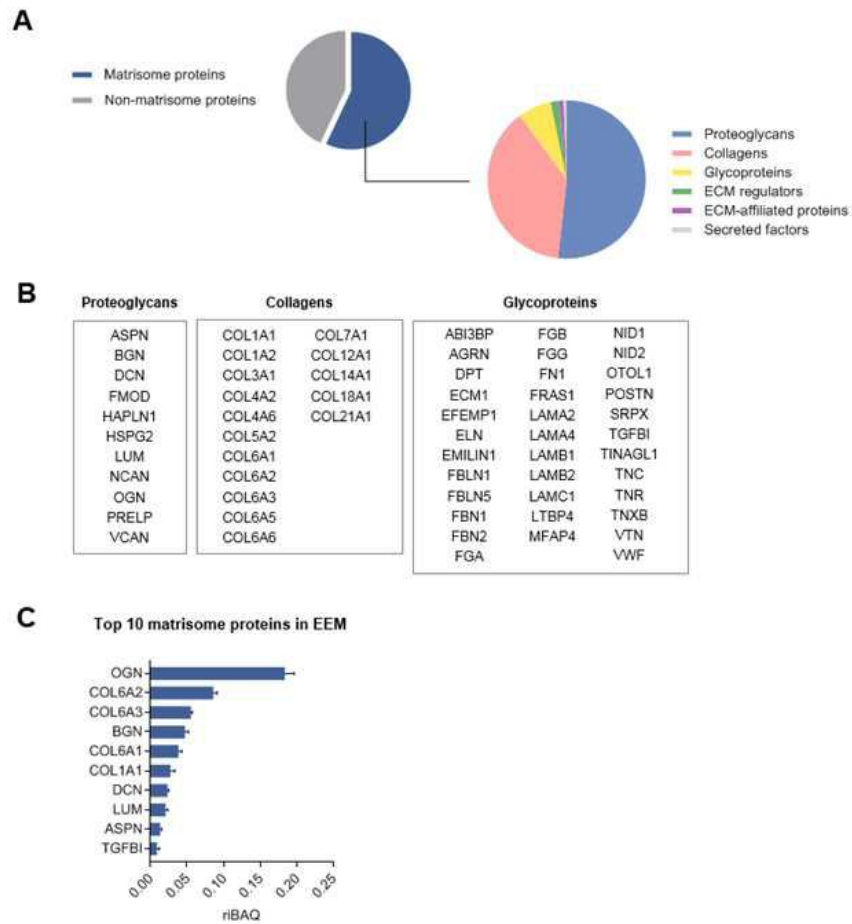
도면2



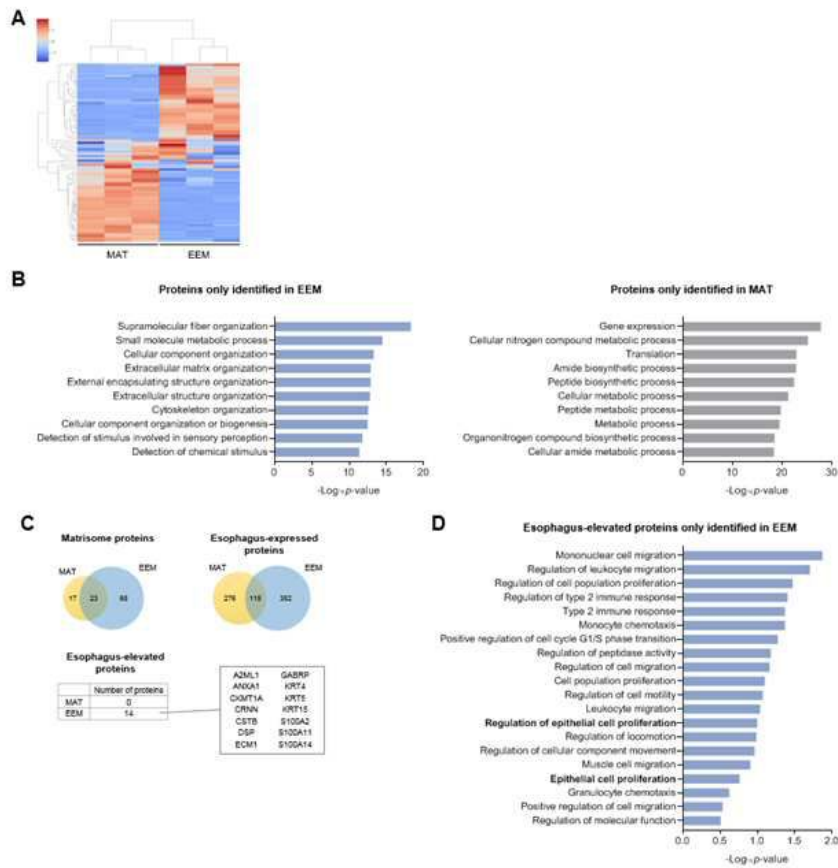
도면3



도면4



도면5



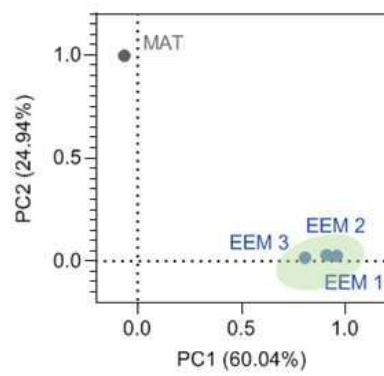
도면6

A

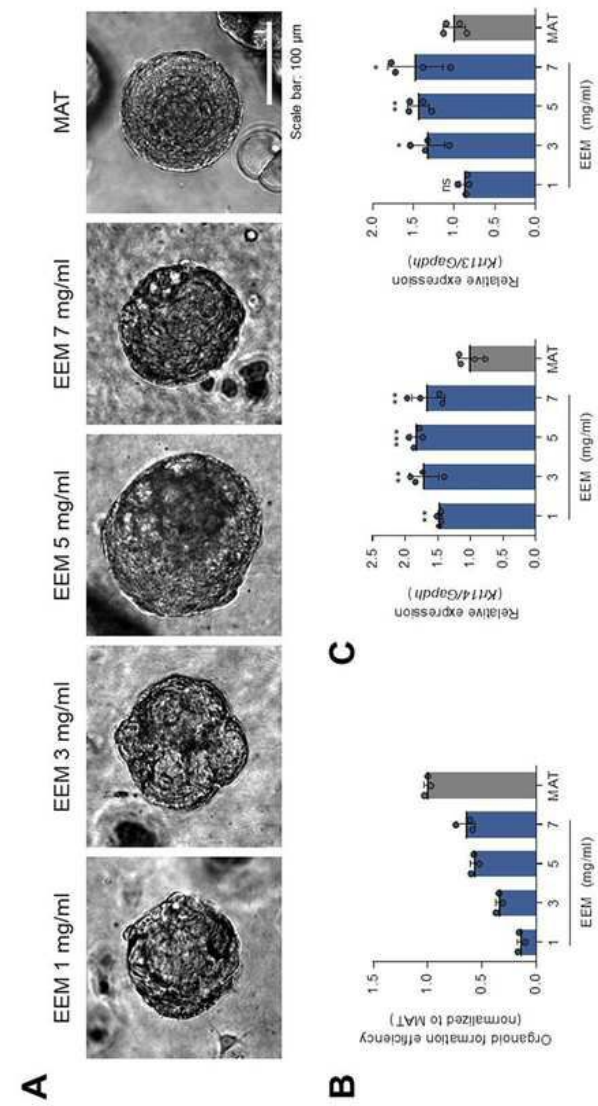
Top 10 core matrisome proteins

EEM 1	EEM 2	EEM 3
OGN	COL6A2	OGN
COL6A2	OGN	BGN
COL6A3	COL1A1	COL6A3
BGN	COL6A1	COL6A1
COL6A1	COL6A3	MFAP4
COL1A1	ELN	COL1A1
DCN	TGFBI	POSTN
LUM	POSTN	TGFBI
ASPN	BGN	ELN
TGFBI	ASPN	ASPN

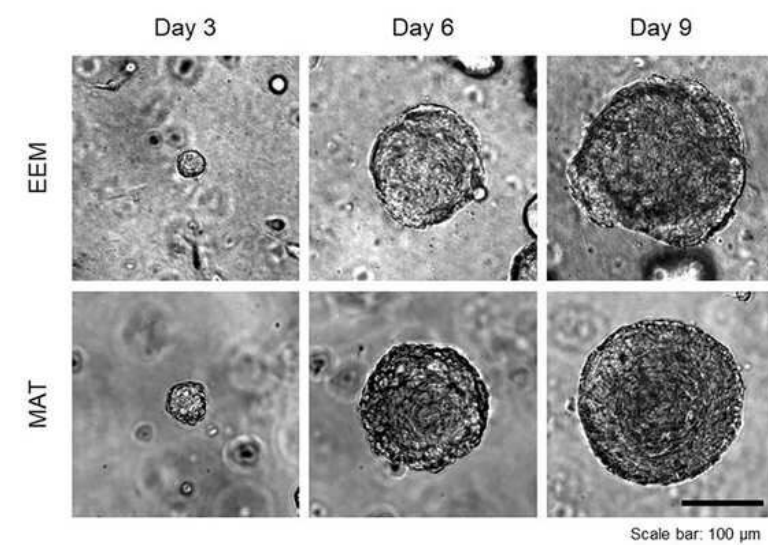
B



도면7

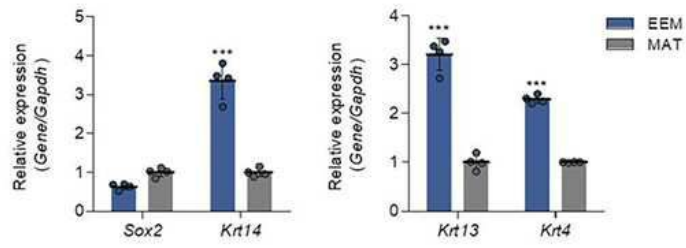


도면8

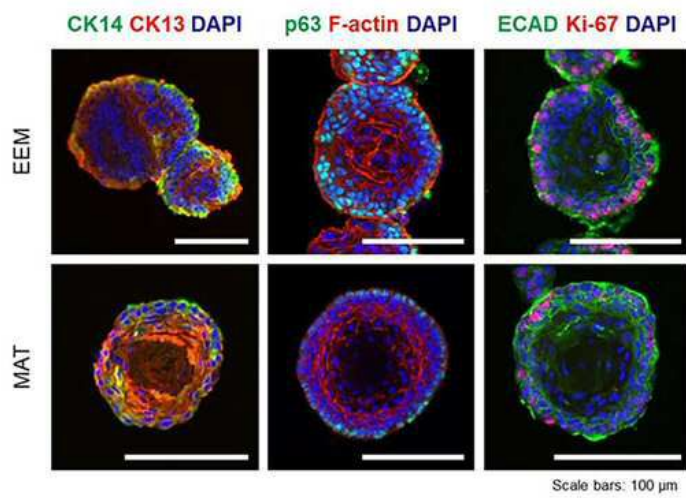


도면9

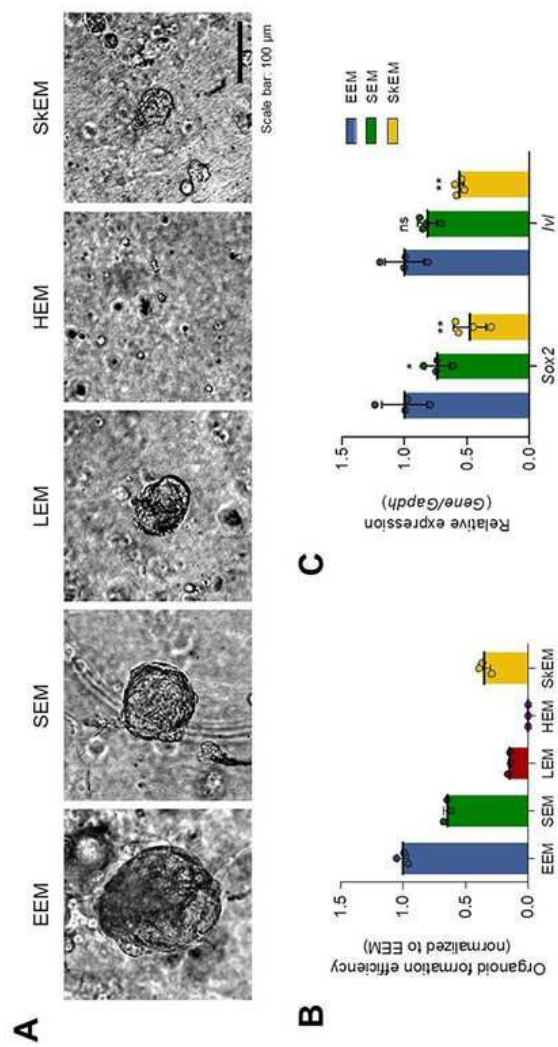
A



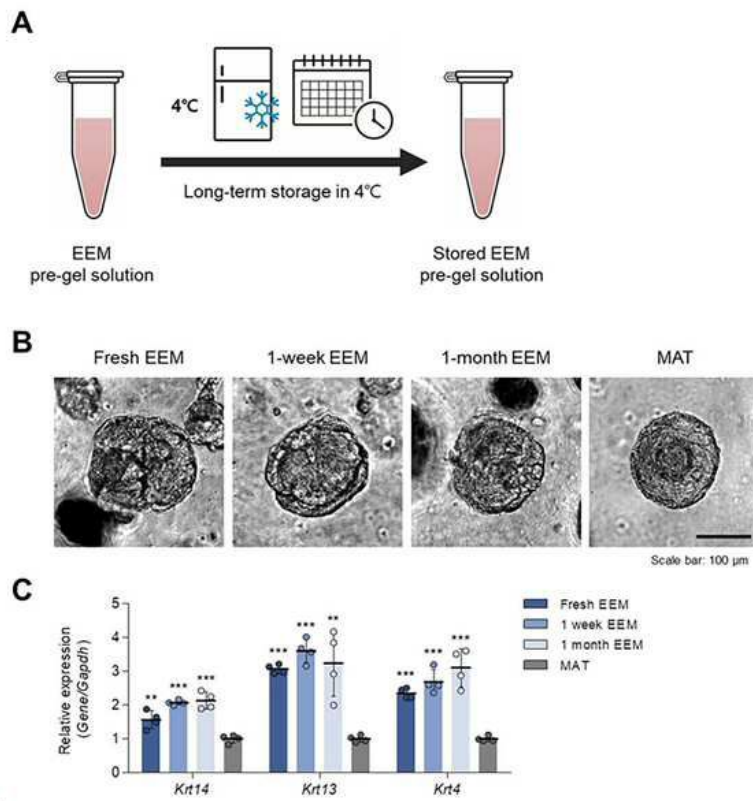
B



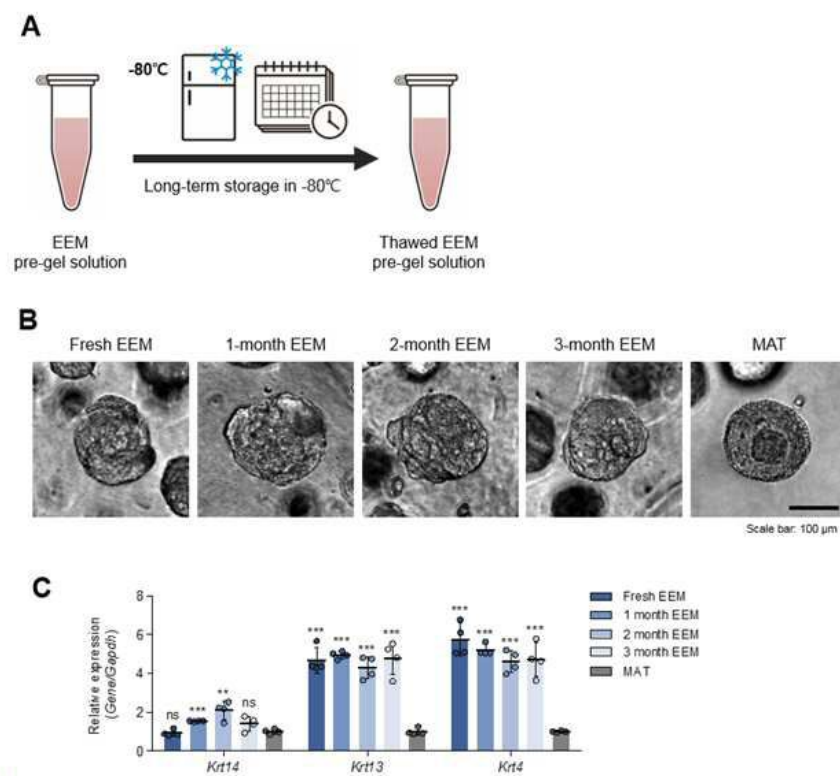
도면10



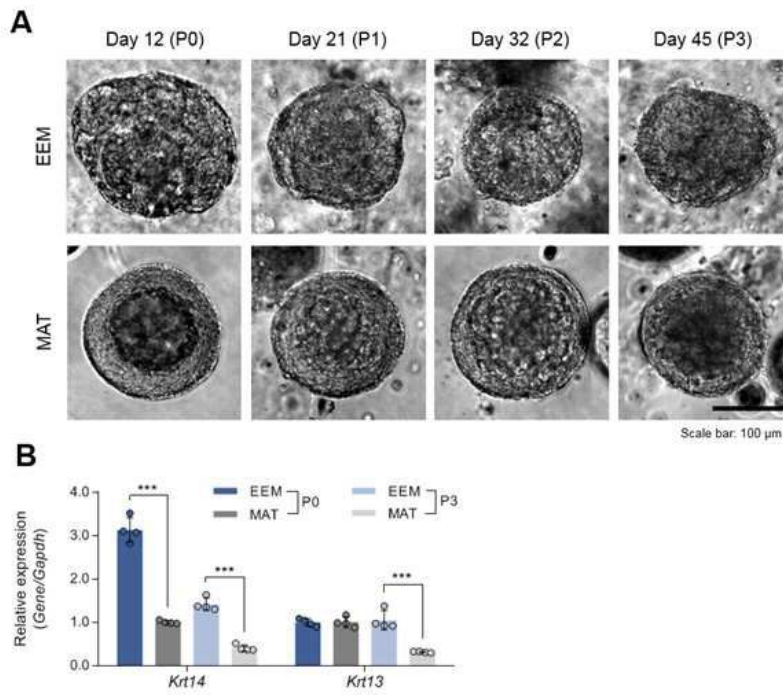
도면11



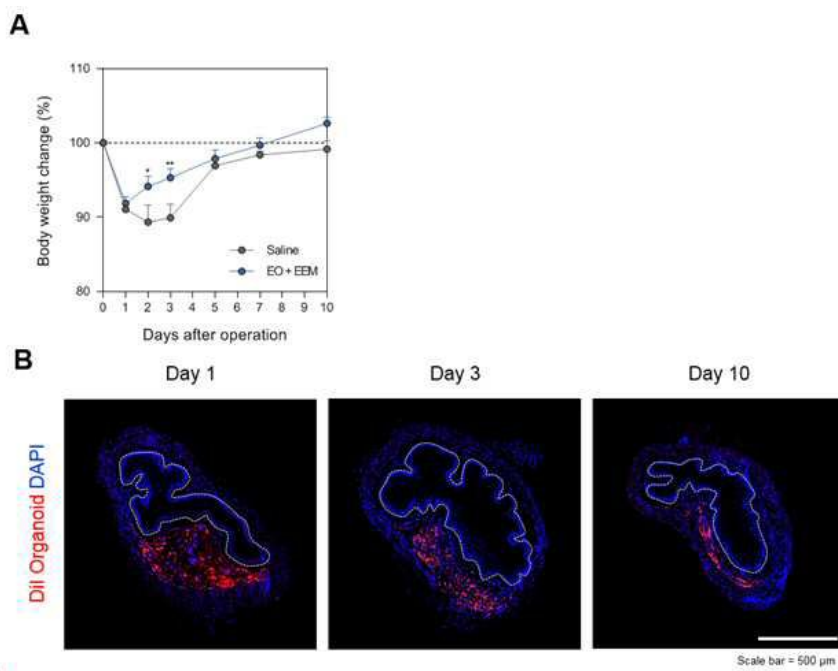
도면12



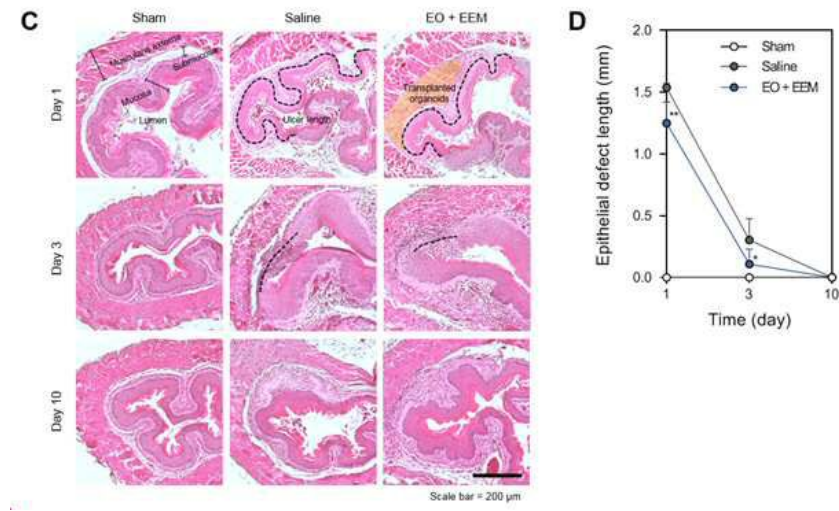
도면13



도면14



도면15



도면16

