



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0158637
(43) 공개일자 2022년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12M 1/12 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0671 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0062798
(22) 출원일자 2022년05월23일
심사청구일자 2022년05월23일
(30) 우선권주장
1020210066220 2021년05월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
조승우
서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호
김수경
서울특별시 마포구 만리재로 99, 1305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

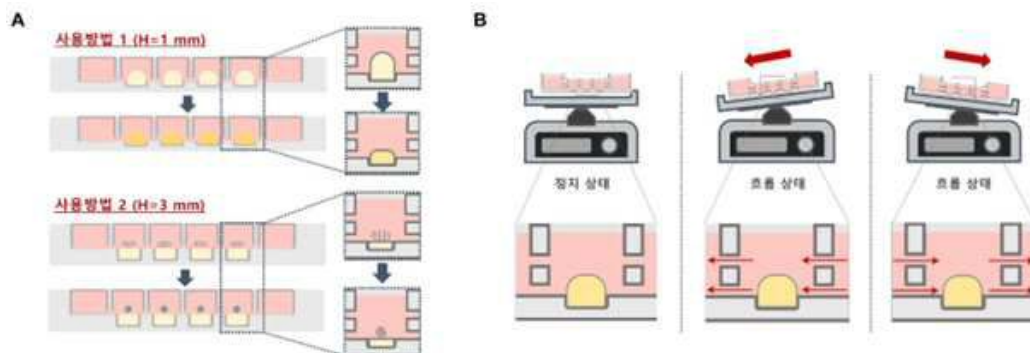
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 비알코올성 지방간 인공 조직 모델

(57) 요약

본 발명은 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 관한 것으로 탈세포 간 조직 유래 세포의 기질과 복수의 마이크로채널을 포함하는 디바이스를 포함하여 매트릭셀, 탈세포 간 조직 유래 세포의 기질에서만 배양되던 종래 기술에 비하여 쿠퍼세포와 간 정상세포가 포함되어 실제 비알코올성 지방간 질환을 더욱 잘 모사할 수 있고, 간 오가노이드의 성장이 개선될 뿐만 아니라 유리 지방산 처리를 통해 간 오가노이드 내 지방 축적 및 염증유발이 잘 일어나고 비알코올성 지방간의 표현형이 더욱 잘 발현할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12M 25/06 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 2500/36 (2013.01)
C12N 2502/00 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2506/14 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)
C12N 2533/90 (2013.01)

(72) 발명자

최보방

03726, 서울특별시 서대문구 연희로8길 20-6, 102호

김 진

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호

배수한

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

한대훈

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 세브란스병원 러들로교수동 204호

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	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415172909
과제번호	20009125
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	3D생체조직칩기반신약개발플랫폼구축사업(R&D)
연구과제명	미세환경 통합 염증 질환모사체 약물유효성 및 독성 스크리닝 플랫폼

기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
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	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

탈세포 간 조직 유래 세포외 기질 (Liver Extracellular Matrix; LEM)을 포함하는 하이드로젤;

간 오가노이드;

상기 하이드로젤이 위치하는 웰 및 유리 지방산 (free fatty acid)이 흐를 수 있는 복수의 마이크로채널을 포함하는 디바이스; 및

유리 지방산을 포함하는 배양액을 포함하는 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 탈세포 간 조직 유래 세포외 기질은 간 조직 세포가 95 내지 99.9% 제거된 것인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 간 오가노이드는 인간 유도만능줄기세포 (hiPSC) 유래 또는 인간 간 조직 유래인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 간 오가노이드가 인간 유도만능줄기세포 (hiPSC) 유래인 경우, 간 오가노이드는 상기 하이드로젤 위에서 배양되는 것인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 간 오가노이드가 인간 조직 유래인 경우, 간 오가노이드는 상기 하이드로젤 내에서 배양되는 것인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 하이드로젤이 위치하는 웰은 깊이가 2 내지 4 mm인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 하이드로젤이 위치하는 웰은 깊이가 0.5 내지 1.5 mm 인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 유리 지방산 (free fatty acid)은 농도가 100 내지 900 μ M인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 간 오가노이드는 혈관세포, 중간엽줄기세포, 쿠퍼 세포 (Kupffer cell, KC) 및 간 성상세포 (hepatic stellate cell, HSC) 중 어느 하나 이상과 공배양되는 것인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델.

청구항 10

제1항의 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 제작하는 단계; 및

상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 유리 지방산을 포함하는 배양액을 관류시키는 단계를 포함하는 비알코올성 지방간 인공 조직 모델의 제작방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 관류시키는 단계는 교반기 상에 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 교반시켜 이루어지는 것인 비알코올성 지방간 인공 조직 모델의 제작방법.

청구항 12

제1항의 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보물질이 처리된 군과 대조군을 비교하는 단계를 포함하는 비알코올성 지방간 치료 약물의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비알코올성 지방성 간 (Non-Alcoholic Fatty Liver: NAFL) 질환은 지방간을 기본 병변으로 하고, 음주 이력이 부족함에도 불구하고, 알코올성 간 장애와 유사한 간 실질의 염증·괴사, 섬유화 (線維化) 등의 조직 변화를 나타내는 병태이다. NAFL는 기본적으로 무증후성이며, 병태의 진행에 따라 지방간으로부터 지방성 간염, 또한 간 경변을 거쳐 간암으로 이행한다. NAFL에서의 지방성 간염을 비알코올성 지방성 간염 (Non-Alcoholic

SteatoHepatitis : NASH) 이라고 칭한다. 특히 최근, 비만 또는 당뇨병 등을 배경으로 하는 대사 증후군이 사회 문제가 되고 있고, NASH도 대사 증후군 중 하나라고 생각되고 있다. NAFL 및 NASH에는 합병증으로서 비만, 당뇨병, 고지혈증 및 고혈압 등의 생활 습관병이 인정되고, 그 임상 병태의 주된 특징으로는 혈중의 알라닌 아미노 트랜스페라아제 (ALT)나 히알루론산 농도의 상승, 그에 비하여 혈중의 총 콜레스테롤이나 알부민 농도의 저하 등을 들 수 있다. 그러나, NAFL 및 NASH의 발증기서는 아직 불명확한 점도 많고, 그 효과적인 치료법 및 치료약이 확립되어 있지 않은 것이 현실이다. 그 원인의 일단은, NAFL 및 NASH는 사람의 생활 습관병을 발증의 기반으로 하므로, NAFL 및 NASH의 연구를 위한 적당한 비인간 모델이 아직 확립되어 있지 않은 데에 있다.

[0004] 간경변, 간암 등 치사성 질환으로 진전될 가능성이 있는 NAFL 및 NASH의 병태의 해명은 효과적인 치료법 및 치료약의 개발에 필수적이며, 이를 위해서는 적절한 NAFL 및 NASH의 모델이 필요하다.

[0005] 지금까지 NASH의 동물 모델에 대해서는 보고되어 있지만 (예를 들어, 특허 문헌 1), NAFL의 비 인간 동물 모델이 거의 보고되어 있지 않다. 더욱이, 최근 동물 윤리와 관련된 문제로 인해 동물 모델의 대안이 되는 in vitro 모델의 개발 필요성이 높아졌다.

[0006] 이에, 본 발명의 발명자들은 비알코올성 지방간 모델에 대해 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2011/013247호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 일 양상은 탈세포 간 조직 유래 세포외 기질 (Liver Extracellular Matrix; LEM)을 포함하는 하이드로젤; 간 오가노이드; 상기 하이드로젤이 위치하는 웰 및 유리 지방산 (free fatty acid)이 흐를 수 있는 복수의 마이크로채널을 포함하는 디바이스; 및 유리 지방산을 포함하는 배양액을 포함하는 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 제작하는 단계; 및 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 유리 지방산을 포함하는 배양액을 관류시키는 단계를 포함하는 비알코올성 지방간 인공 조직 모델의 제작방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보물질이 처리된 군과 대조군을 비교하는 단계를 포함하는 비알코올성 지방간 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

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 이용 가능하다. 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 탈세포 간 조직 유래 세포의 기질 (Liver Extracellular Matrix; LEM)을 포함하는 하이드로젤; 간 오가노이드; 상기 하이드로젤이 위치하는 웰 및 유리 지방산 (free fatty acid)이 흐를 수 있는 복수의 마이크로채널을 포함하는 디바이스 및 유리 지방산을 포함하는 배양액을 포함하는 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예로 상기 탈세포 간 조직 유래 세포의 기질 (Liver Extracellular Matrix; LEM)은 간 조직 세포가 95 내지 99.9% 더욱 구체적으로 96 내지 98%, 가장 구체적으로는 97.18%가 제거된 것일 수 있다. 상기 범위 외의 간 조직 세포 제거 수준으로 탈세포가 이루어질 경우 제조된 지지체 조성물의 품질이 저하되거나 고정 경제성이 떨어지는 문제점이 있다.
- [0020] 상기 “세포외기질(extracellular matrix)”은 포유류 및 다세포 생물(multicellular organisms)에서 발견되는 단백질 성분으로서 조직의 탈세포화를 통해 제조된 세포 배양용 자연 지지체를 의미한다. 상기 세포외기질은 투석 또는 가교화를 통해 더 처리할 수 있다.
- [0021] 상기 세포외기질은 콜라겐(collagens), 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸(proteoglycans), 항균제(antimicrobials), 화학유인물질(chemoattractants), 사이토카인 (cytokines), 및 성장 인자에 제한되지 않는, 구조형 및 비구조형 생체 분자(biomolecules)의 혼합물일 수 있다.
- [0022] 상기 세포외기질은 포유 동물에 있어서 다양한 형태로서 약 90%의 콜라겐을 포함할 수 있다. 다양한 생체 조직에서 유래한 세포외기질은 각각의 조직에 필요한 고유 역할 때문에 전체 구조체 및 조성이 상이할 수 있다.
- [0023] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예로 상기 간 오가노이드는 인간 유도만능줄기세포 (hiPSC) 유래 또는 인간 간 조직 유래일 수 있다.
- [0025] 상기 “오가노이드(organoid)”는 조직 또는 전분화능줄기세포에서 유래된 세포를 3D 형태로 배양하여 인공장기와 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.
- [0028] 구체적으로, 상기 간 오가노이드가 인간 유도만능줄기세포 (hiPSC) 유래인 경우, 간 오가노이드는 상기 하이드로젤 위에서 배양되는 것일 수 있다. 이는 하이드로젤을 우선 웰에 주입하여 하이드로젤 베드(gel bed)를 형성하고 여기에 오가노이드를 배양하는 방식으로, 하이드로젤 베드 위에 세포를 주입하면 24시간 내에 3차원 구조를 가지는 오가노이드가 형성된다. 이 경우 오가노이드는 매트릭스의 지지작용을 받으면서도 배양액 미세유체 흐름을 받으며 배양될 수 있으며 특히 오가노이드가 배양액에 직접 노출이 되므로 오가노이드 내부로의 배양액 전달 효율이 매우 우수한 장점이 있다. 이러한 간 오가노이드 및 하이드로젤의 배양 구조를 통해 3차원 구조를 가지는 오가노이드가 형성될 수 있다.
- [0029] 그리고, 상기 간 오가노이드가 인간 조직 유래인 경우, 간 오가노이드는 상기 하이드로젤 내에서 배양되는 것일 수 있다. 이러한 구조로 배양되는 경우 배양 시간이 지나면서 하이드로젤이 응축하면서 단단한 매트릭스를 형성하고, 오가노이드가 포함된 하이드로젤은 배양 과정 중 웰 바닥에 계속 붙어있기 때문에 오가노이드가 배양액의 미세유체 흐름을 지속적으로 받으면서 배양될 수 있는 효과가 있다.

- [0030] 상기 디바이스는 하이드로젤이 위치하는 웰 및 유리 지방산 (free fatty acid)이 흐를 수 있는 복수의 마이크로 채널을 포함하는 것으로, 디바이스는 공지의 소재를 이용하여 제작될 수 있고, 구체적으로는 PDMS 고분자로 제작될 수 있다. 또한, 상기 디바이스는 복수의 챔버로 구성될 수 있으며 구체적으로는 미디어가 연결되어 있는 칩 유닛이 8개가 있고, 각 유닛에는 4개의 D=7.10 mm 규격의 배양 챔버로 구성되며, 각 챔버에는 D=5 mm 규격의 웰, 각 유닛의 양끝에는 가로 길이가 8.66 mm인 미디어 챔버로 구성되어 있을 수 있다. 전술한 규격으로 디바이스를 제작할 경우 96-웰 플레이트와 동일한 규격으로 제작되어 High-throughput 멀티웰 디바이스로서도 활용할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 간 오가노이드가 인간 유도만능줄기세포 (hiPSC) 유래인 경우, 상기 하이드로젤이 위치하는 웰은 깊이가 2 내지 4 mm, 구체적으로는 3 mm일 수 있고, 간 오가노이드가 인간 조직 유래인 경우, 상기 하이드로젤이 위치하는 웰은 깊이가 0.5 내지 1.5 mm, 구체적으로는 1 mm일 수 있다. 상기 범위 외로 웰의 깊이가 제작될 경우, 채널에 의한 배양액의 흐름이 하이드로젤 내부의 오가노이드에 제대로 전달되지 못할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예로 상기 유리 지방산 (free fatty acid)은 농도가 100 내지 900 μ M, 구체적으로는 200 내지 800 μ M, 가장 구체적으로 800 μ M일 수 있다. 유리 지방산은 전술한 디바이스에 구비된 복수의 마이크로 채널을 통해 하이드로젤이 위치하는 웰까지 흐르게 되어 하이드로젤 상 또는 내부에 있는 간 오가노이드에 영향을 주게 된다. 상기 농도 범위 외로 유리 지방산이 사용될 경우 비알코올성 지방간의 특징이 나타나지 않거나 조직 모델 내 세포가 사멸될 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 유리 지방산을 포함하는 배양액은 간 오가노이드를 배양함과 동시에 간 오가노이드를 배양액에 포함된 유리 지방산에 지속적으로 노출시켜 비알코올성 지방간이 유발되도록 한다. 상기 배양의 구성성분은 유리 지방산 외에 간 오가노이드 배양에 사용되는 공지의 물질을 혼합할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예로 상기 유리 지방산은 올레산 (oleic acid), 팔 미트산 (palmitic acid), 리놀레산 (linoleic acid) 중 선택된 어느 하나, 구체적으로는 올레산 (oleic acid)일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 구체예로 상기 간 오가노이드는 혈관세포, 중간엽줄기세포, 쿠퍼 세포 (Kupffer cell, KC) 및 간 성상세포 (hepatic stellate cell, HSC) 중 어느 하나 이상, 구체적으로는 쿠퍼 세포 (Kupffer cell, KC) 및 간 성상세포 (hepatic stellate cell, HSC) 와 공배양되는 것일 수 있다. 상기 쿠퍼 세포는 간에 존재하는 면역 세포로서 비알코올성 지방간 유도를 통해 염증성 쿠퍼세포가 활성화되면 사이토카인 및 활성산소종 (ROS)을 분비하는 등의 역할을 한다. 또한, 상기 간 성상세포는 비알코올성 지방간 질환에 있어서 섬유성 인자를 분비하는 역할을 한다. 본 발명의 비알코올성 지방간 인공 조직 모델은 간 오가노이드 뿐만 아니라 전술한 쿠퍼 세포 및 간 성상세포 중 어느 하나 이상을 더 포함함으로써 간의 미세환경을 더욱 구체적으로 반영하고, 이를 통해 모사도가 높은 비알코올성 지방간을 제작할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 일 양상은 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 제작하는 단계; 및 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 유리 지방산을 포함하는 배양액을 관류시키는 단계를 포함하는 비알코올성 지방간 인공 조직 모델의 제작방법을 제공한다.
- [0038] 상기 비알코올성 지방간 인공조직 모델을 제작하는 단계는 상기한 비알코올성 지방간 인공조직 모델을 제작하는 단계로서, 구체적으로 PDMS 고분자를 이용하여 하이드로젤이 위치하는 웰 및 유리 지방산 (free fatty acid) 이 흐를 수 있는 복수의 마이크로채널을 포함하는 디바이스 (미세유체칩)를 제작하는 단계; 및 상기 웰에 하이드로젤과 간 오가노이드를 위치시키는 단계로 이루어질 수 있다. 하이드로젤, 간 오가노이드 및 디바이스의 구체적인 내용은 전술한 비알코올성 지방간 인공 조직 모델의 설명과 같다.
- [0039] 상기 관류시키는 단계는 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 유리 지방산을 포함하는 배양액을 관류시키는 단계이다. 유리 지방산을 포함하는 배양액은 전술한 바와 같이 디바이스의 마이크로채널을 통해 하이드로젤과 간 오가노이드가 위치하는 웰로 흐르게 되고, 간 오가노이드가 유리 지방산에 지속적으로 노출됨으로써 비알코올성 지방간의 표현형을 나타내게 된다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예로 상기 관류시키는 단계는 교반기 상에 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 교반시켜 이루어지는 것일 수 있다. 상기 유리 지방산을 포함하는 배양액의 관류는 공지의 장치를 통해 이루어질 수 있으나, 접근, 작동 편의성이 높은 교반기를 사용함으로써 간 오가노이드에 지속적으로 배양액의 흐름을 만들어 줄 수 있다. 구체적으로 교반기 상에 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 위치시키고, 배양액을 채운 다

음 교반기를 작동시키면 좌우 방향으로 기울어짐에 따라 배양액이 흘러 관류가 일어나게 된다.

- [0042] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보 물질이 처리된 군과 대조군을 비교하는 단계를 포함하는 비알코올성 지방간 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0043] 상기 후보물질을 처리하는 단계는 상기 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 후보물질을 처리하는 단계로서, 후보 물질의 처리방법은 후보물질의 목적하는 투여경로, 투여량 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0044] 그리고, 상기 후보물질이 처리된 군과 대조군을 비교하는 단계는 후보물질을 처리한 비알코올성 지방간 인공 조직 모델과 대조군을 비교하는 단계일 수 있다. 상기 대조군은 종래 알려진 비알코올성 지방간 치료 약물 또는 비알코올성 지방간 모델 내 간 오가노이드의 생리활성을 저해 또는 상승시키지 않는 범위에서 공지의 물질을 비알코올성 지방간 인공 조직 모델에 처리하거나 또는 비처리한 비알코올성 지방간 인공 조직 모델일 수 있다.
- [0045] 상기 후보물질이 처리된 군과 대조군의 비교는 간 오가노이드 내 지방 축적 수준 분석, 간 오가노이드의 생존율, 간 오가노이드의 분화, 기능성 분석 및/또는 간 오가노이드 또는 배양액 내 분비된 여러 지표들을 확인하여 이루어질 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 스크리닝 방법은 비알코올성 지방간 치료 약물을 선정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 선정하는 단계는 전술한 비교하는 단계를 통해 간 오가노이드 내 지방 축적 저감, 간 오가노이드의 생존율 증가, 간 오가노이드의 분화, 기능성 회복 및/또는 간 오가노이드 또는 배양액 내 분비된 개선 지표들의 증가 등이 확인되는 경우 비알코올성 지방간 치료 약물로 선정하는 것일 수 있다. 대조군으로 종래 알려진 비알코올성 지방간 치료 약물을 사용할 경우, 대조군에 비하여 개선된 효과를 나타내는 경우 종래 알려진 비알코올성 지방간 치료 약물보다 개선된 효과를 가진 것으로 판단, 선정될 수 있다.

발명의 효과

- [0048] 본 발명의 비알코올성 지방간 인공 조직 모델은 탈세포 간 조직 유래 세포의 기질과 복수의 마이크로채널을 포함하는 디바이스를 포함하여 매트릭셀, 탈세포 간 조직 유래 세포의 기질에서만 배양되던 종래 기술에 비하여 쿠퍼세포와 간 성상세포가 포함되어 실제 비알코올성 지방간 질환을 더욱 잘 모사할 수 있고, 간 오가노이드의 성장이 개선될 뿐만 아니라 유리 지방산 처리를 통해 간 오가노이드 내 지방 축적 및 염증유발이 잘 일어나고 비알코올성 지방간을 더욱 잘 모사할 수 있는 효과가 있다.
- [0049] 또한, 본 발명의 비알코올성 지방간 인공 조직 모델은 비알코올성 지방간을 모사하기 때문에 이를 이용하여 비알코올성 지방간 치료 약물을 스크리닝하는 데 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 탈세포 간 조직 유래 세포의 기질을 분석한 결과이다.
- 도 2 및 3은 비알코올성 지방간 인공 조직 모델 제작을 위한 디바이스의 구성 및 작용방식을 나타내는 도면이다.
- 도 4는 본 발명 디바이스에서 간 오가노이드를 배양한 결과이다.
- 도 5는 유리 지방산 처리농도의 최적화를 위한 실험 결과를 나타내는 것이다.
- 도 6 내지 10 은 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델 구축을 위한 최적의 배양조건 선별 결과를 나타낸 것으로, 도 6 내지 8은 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델 구축을 위한 최적화된 배양 플랫폼 선별을 위한 실험 결과이고, 도 9는 비알콜성 지방간염 (NASH) 유발에 최적화된 chip 기반 배양 플랫폼에서의 유체 이동 시뮬레이션 결과를 나타낸 것이며, 도 10은 비알콜성 지방간염 (NASH) 유발에 최적화된 chip 기반 배양 플랫폼에서의 지방산 흡수 시뮬레이션 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11 내지 14는 간 조직 특이적 미세환경 세포의 공배양을 통한 오가노이드 분화 증진 효과를 확인한

결과로서, 도 11은 간 조직 미세환경이 통합된 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 위한 쿠퍼세포 (Kupffer cell) 분화 결과, 도 12는 간 조직 미세환경이 통합된 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 위한 간 성상세포 (hepatic stellate cell; HSC) 분화 및 도 13은 인간 조직 유래 간 오가노이드의 미세환경 세포 공배양 유무에 따른 간 분화 및 기능성 비교 결과를 나타내는 것이다. 도 14는 인간 iPSC 유래 간 오가노이드의 미세환경 세포 공배양 유무에 따른 간 분화 및 기능성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 15 내지 17은 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델을 이용한 약물 유효성 평가 결과를 나타낸 것으로, 도 15는 Obeticholic acid (OCA)로 검증한 결과, 도 16은 Ezetimibe (Eze)로 검증한 결과 및 도 17은 Dapagliflozin (DAPA)로 검증한 결과이다.

도 18 내지 22는 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 기반 선별된 유효약물의 기전 규명 및 효과를 검증한 결과를 나타낸 것이다. 도 18은 인간 조직 유래 간 오가노이드 기반 비알콜성 지방간염 모델에서의 약물 유효성을 검증한 결과이고, 도 19, 20은 인간 iPSC 유래 간 오가노이드 기반 비알콜성 지방간염 모델에서의 약물 유효성을 검증한 결과이며, 도 21은 인간 조직 유래 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 이용한 유효약물의 효능 비교 및 치료 기전을 규명한 결과이며, 도 22는 인간 조직 유래 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 이용한 유효 약물의 효능 비교 및 치료 기전을 규명한 결과이다.

도 23 내지 28은 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델에서 발굴된 신규 치료 약물의 유효성 평가 및 관련 기전을 검증 (NASH 동물모델에서 약물의 효능 평가 및 기전 연구)한 결과를 나타낸 것으로, 도 23 내지 26는 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 DAPA 약물 유효성 검증 결과를 나타낸 것이다. 도 27은 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 유효 약물의 효능 비교 및 치료 기전을 규명한 결과, 도 28은 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 유효 약물의 효능 비교 및 치료 기전을 규명한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1: 비알콜성 지방간 인공 조직 모델의 제작

[0055] 실시예 1-1. 탈세포 간 조직 유래 세포외 기질의 제작

[0056] 돼지 간 조직 분리하고 세절하여 준비하였고, 상기 간 조직을 1% Triton X-100 및 0.1% 수산화 암모늄(ammonium hydroxide)과 함께 교반하여 간 조직의 세포만을 제거하여 탈세포 간 조직을 제조하였다. 이후, 탈세포 간 조직을 동결건조, 분쇄하여 탈세포 간 조직 유래 세포외기질 (Liver Extracellular Matrix; LEM)을 제조하였다.

[0057] 상기 탈세포 간 조직 유래 세포외기질 10 mg을 4 mg/ml 펩신 용액 (펩신 파우더 4 mg를 0.02 M HCl 1 ml에 녹인 용액)에 48시간 동안 용해시킨다. 10X PBS와 1 M NaOH를 이용하여 중성 pH와 1X PBS 버퍼의 전해질 상태로 균일하게 섞은 후 37℃의 온도에서 30분 동안 겔화(gelation)시켜 하이드로젤 형태의 지지체 조성물을 제조하였다.

[0059] 상기 제조된 탈세포 간 조직 유래 세포외 기질은 탈세포 과정 전후 H&E 염색을 실시하여 제작한 탈세포 매트릭스의 구조는 잘 유지되고 세포 성분은 모두 제거되었음을 확인하였고 주사전자현미경 이미지를 통해 내부 구조를 이루는 섬유다발이 안정적인 고분자 네트워크를 형성하는 것을 확인하였다. DNA 정량 비교와 대표적인 세포외 기질 성분 중 하나인 Glycosaminoglycan (GAG)에 대한 정량 분석을 통해서도 세포성분은 대부분 제거되고 GAG는 잘 보존되어 있는 것을 확인하였다 (도 1A).

[0060] 또한, 탈세포 간 조직 유래 지지체의 구성성분들을 파악하기 위해 단백질체 분석(Proteomics)을 실시하여 간 조직 특이적인 다양한 세포외기질 (Collagens, Glycoproteins, Proteoglycans) 및 성장인자 단백질들이 LEM에 포함되어 있는 것을 확인하였다. 그리고, 기존 상용화된 지지체인 매트릭스(MAT)는 ECM Glycoproteins이 대부분인 반면, 탈세포 간 조직 매트릭스(LEM)는 Collagens과 ECM Glycoproteins이 가장 많고 Proteoglycans와 ECM regulators 순으로 다양한 성분으로 구성되어 있음을 확인하였다. 가장 많은 양이 검출된 10개의 세포외기질 (ECM) 단백질들 중 LEM에 특이적으로 존재하는 Biglycan (BGN), Lumican (LUM), Asporin (ASPN)은 간 조직 발달 시 ECM remodeling에 관여하는 주요 단백질이며 PRELP는 정상적인 간세포 구조를 유지하는데 중요한 역할을

하는 단백질로 알려져 있다. 이를 통해 제작된 탈세포 간 조직 유래 세포외기질(LEM) 지지체가 매트리지엘에 비해 간 구조, 발달, 기능에 있어 중요한 역할을 담당하는 실제 간 조직에 존재하는 다양한 세포외기질 단백질을 포함하고 있음을 확인하였다 (도 1B).

[0062] 실시예 1-2. 비알코올성 지방간 인공 조직 모델을 위한 디바이스 제작

[0063] PDMS 고분자를 이용하여 미세유체칩 (microfluidic chip) 제작 방식으로 제작된 디바이스에는 미디어가 연결되어 있는 칩 유닛이 8개가 있고, 각 유닛은 4개의 D=7.10 mm 규격의 배양 챔버로 구성되며, 각 챔버에는 D=5 mm 규격의 웰 (깊이는 H=3 mm, 1 mm 두가지로 제작), 각 유닛의 양끝에는 가로 길이가 8.66 mm인 미디어 챔버가 위치하도록 디바이스를 제작하였다 (도 2A).

[0064] 구체적으로, 개발된 32-멀티웰 디바이스 형태로 제작되면 지방간염을 보다 효율적으로 유발할 수 있을 뿐 아니라 질환 오가노이드의 고효율 (high-throughput) 약물 스크리닝이 가능하다. High-throughput 멀티웰 디바이스는 기존의 96-웰 플레이트와 동일한 규격을 가지고 있어 플레이트 리더를 포함한 범용적인 96-웰 기반 분석 장비에 호환 적용이 가능하게 제작하였다 (도 2B).

[0065] 간 오가노이드가 인간 유도만능줄기세포 (hiPSC) 유래인 경우 간 오가노이드는 깊이가 3 mm인 웰에 위치한 상기 세포외 기질 위에서 배양되고, 간 오가노이드가 인간 조직 유래인 경우 간 오가노이드는 깊이가 1 mm인 웰에 위치한 상기 세포외 기질 내에서 배양하였다 (도 3A).

[0066] 여기에 추가적으로 디바이스는 시중에서 쉽게 구할 수 있는 교반기 (rocking shaker)를 이용하여 효과적인 미세 유체 흐름 형성이 가능하도록 제작하였다 (도 3B).

[0068] 실험예 1: 본 발명 디바이스에서 간 오가노이드 배양 확인 및 비알코올성 지방간 모델의 최적화

[0069] 실험예 1-1. 본 발명 디바이스에서 간 오가노이드 배양 확인

[0070] 전술한 디바이스에서 탈세포 간 조직 유래 세포외 기질 (LEM)을 기반으로 간 오가노이드를 배양하고 기존 정적인 배양환경의 웰 플레이트와 비교하였다. 구체적으로 인간 간 조직으로부터 제작한 간 오가노이드를 사용했으며 배양 7일차에 분석을 진행하였다.

[0071] 그 결과 도 4에서 확인되는 바와 같이, 기존 웰 플레이트 상에서 배양된 간 오가노이드 (LEM-plate)에 비해 본 발명의 디바이스에서 배양된 간 오가노이드 (LEM-chip)의 크기가 유의미하게 증가한 것을 확인하였다. 오가노이드 크기를 정량 분석했을 때, 디바이스에서 배양액 흐름을 받으면서 배양된 간 오가노이드 그룹에서 유의미한 크기 증가를 확인하였다 (도 4 A).

[0072] 또한, 전술한 결과를 검증하기 위해 증식능 (proliferation) 관련 마커 KI67의 면역염색을 진행했을 때, 플레이트에서 배양된 대조군 매트리지엘 그룹과 탈세포 간 조직 유래 지지체 그룹은 비슷한 증식능을 보였으나 탈세포 간 조직 유래 지지체와 미세유체 디바이스가 결합된 그룹에서 유의미하게 KI67 발현이 증가한 것을 확인하였다 (도 4B). 이를 통해 산소 및 영양분 공급이 원활하게 일어나 간 오가노이드의 증식능이 크게 증가되어 오가노이드 크기가 커졌을 것으로 추측된다.

[0073] 그리고, 정량적 PCR 방법으로 유전자 발현을 비교하였을 때, 정적인 플레이트 배양환경에서 제작된 간 오가노이드에 비해 본 발명 디바이스에서 배양된 간 오가노이드는 LGR5, KRT19, HNF4A, SOX9 및 FOXA2의 발현량이 증가된 것을 확인하였다 (도 4C).

[0075] 실험예 1-2. 유리 지방산 처리농도의 최적화

[0076] 지방간염 오가노이드 유발 효율이 가장 우수한 탈세포 간 조직 유래 세포외 기질-멀티웰 미세유체 디바이스 플랫폼 (LEM-Chip)에서 인간 간 오가노이드를 배양하고 유리 지방산 (Oleic acid)을 농도별로 처리하여 질병 모델 제작을 위한 최적 농도를 테스트하였다.

[0077] 그 결과 탈세포 LEM 하이드로젤과 멀티웰 디바이스가 결합된 플랫폼에서 인간 조직 유래 간 오가노이드를 배양하고 지방산을 농도별로 처리하였을 때, 농도별로 간 오가노이드의 내부에 지방이 축적되어 염증이 일어나고 간

오가노이드 특이적인 형태와 구조가 손상되어 변형되는 것을 확인하였다 (도 5A).

[0078] 간 오가노이드 내부의 지방 축적량을 면역염색을 통해 확인했을 때, 처리한 지방산의 농도가 높아질수록 오가노이드 내부에 축적되는 지방의 양이 증가하는 것을 통해 탈세포 LEM-멀티웰 디바이스 플랫폼에서 비알코올성 지방간 오가노이드 모델 구현이 가능함을 확인하였다 (도 5B).

[0079] 정량적 PCR 분석을 통해 지방산 처리 농도별로 유전자 발현량을 분석한 결과, 800 μ M 고농도 처리한 경우 지방간염 오가노이드의 특징이 가장 잘 나타난 것을 확인하였다. 추가적으로 간 기능성 분석인 요소합성 능력을 비교해 보았을 때, 지방산 처리 농도가 증가함에 따라 요소합성 능력도 감소하는 것을 확인하였다 (도 5C).

[0080] * PLIN2 : Lipid droplet marker, HES1 : NASH/Fibrosis-related notch signaling marker, CASP3 : Cell death marker, LGR5 : Stemness marker, HNF4A : Mature hepatocyte marker

[0082] 실험예 2: 비알코올성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델 구축을 위한 최적의 배양조건 선별

[0083] 실험예 2-1. 비알코올성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델 구축을 위한 최적화된 배양 플랫폼 선별 (1)

[0084] 비알코올성 지방간염 오가노이드 모델 구축을 위한 최적의 배양 플랫폼을 선별하기 위해 (1) 기존 상용화된 배양 지지체인 매트리지 (MAT), (2) 탈세포 간 조직 지지체 (LEM), (3) 탈세포 간 조직 지지체와 멀티웰 디바이스가 결합된 시스템 (LEM-Chip) 이렇게 3가지 배양 조건에서 인간 간 오가노이드를 제작하고 800 μ M 유리 지방산 (Oleic acid)을 처리하여 지방간 모델을 유발하였다. 간 오가노이드는 인간 간 조직에서 추출한 성체 간 줄기세포를 이용하여 제작하였다.

[0085] 그 결과 탈세포 LEM 하이드로젤 지지체 내에서 간 오가노이드를 배양했을 때 매트리지 그룹(MAT)과 유사한 모양 및 크기의 간 오가노이드가 형성되는 것을 확인하였고 멀티웰 디바이스가 결합된 배양환경에서는 채널을 통한 배양액의 미세 흐름(flow) 영향으로 산소공급이 원활하게 되어 크기가 더욱 커진 간 오가노이드가 형성되는 것을 확인하였다. 지방산 처리를 통해 지방간 모델을 유발했을 때에도 오가노이드 내부로의 지방 축적 및 염증유발이 LEM-chip 그룹에서 가장 잘 유도되는 것을 확인하였다 (도 6 A).

[0086] 또한, 각 배양조건에 따른 NASH 질환 유발효율을 평가하기 위해 3일 동안 간 오가노이드에 지방산 처리 후 정량적 PCR로 확인했을 때, 대조군 매트리지 그룹(MAT) 및 탈세포 간 조직 지지체 그룹(LEM)과 비교하여 탈세포 간 조직 지지체-멀티웰 디바이스 그룹(LEM-Chip)에서 NASH 질환 유발이 더 잘 되는 것을 확인하였다 (도 6B). (TNF- α : 염증 마커, SMA : 지방간/섬유화 마커, PLIN2 : 지방축적 마커, ALB : 성숙한 간 분화 마커)

[0087] 이를 통해 탈세포 간 조직 유래 지지체와 멀티웰 디바이스가 결합된 간 오가노이드 배양 플랫폼을 최적의 플랫폼으로 선별하고 추후 NASH 유발 실험에 이용하였다.

[0089] 실험예 2-2. 비알코올성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델 구축을 위한 최적화된 배양 플랫폼 선별 (2)

[0090] 비알코올성 지방간염 오가노이드 모델 구축을 위한 최적의 배양 플랫폼을 선별하기 위해 (1) 기존 상용화된 배양 지지체인 매트리지 (MAT), (2) 탈세포 간 조직 지지체 (LEM), (3) 탈세포 간 조직 지지체와 멀티웰 디바이스가 결합된 시스템 (LEM-Chip) 이렇게 3가지 배양 조건에서 인간 간 오가노이드를 제작하고 800 μ M 유리 지방산 (Oleic acid)을 처리하여 지방간 모델을 유발하였다. 간 오가노이드는 인간 간 조직에서 추출한 성체 간 줄기세포를 이용하여 제작하였다.

[0091] 그 결과, 3가지 배양조건에서 3일간 지방간염을 유발하고 면역염색을 통해 지방간염 유발효율을 비교하였을 때, 기존 정적인 배양환경(웰 플레이트)의 MAT, LEM 조건에서 배양된 간 오가노이드에서 보다 멀티웰 디바이스가 결합된 배양환경에서 배양된 오가노이드에서 간 섬유화 마커인 SMA, VIM의 발현이 훨씬 높은 수준으로 관찰되었다 (도 7A).

[0092] 또한, 각 배양조건에 따른 NASH 질환 유발효율을 Oil red O 염색(세포 내 지방 염색)으로 확인했을 때, 정적인 배양 환경의 대조군 매트리지 그룹(MAT) 및 탈세포 간 조직 지지체 그룹(LEM)과 비교하여 탈세포 간 조직 지지체-멀티웰 디바이스 그룹(LEM-Chip)에서 간 오가노이드 내부에 지방산 축적이 더 잘 유도되는 것을 확인하였다 (도 7B).

[0093] 그리고, Masson's Trichrome (MT) 염색을 통해 오가노이드 내부에 축적된 콜라겐을 확인했을 때에도, MAT 그룹

및 LEM 그룹 보다 LEM-Chip 그룹에서 축적된 콜라겐의 양이 더 많은 것을 확인하였다. 이를 통해, 정적인 배양 조건과 비교하여 미세유체 칩을 이용한 배양 조건에서 처리된 지방산이 마이크로 채널을 통한 미세 흐름(flow)에 의해 간 오가노이드 내부로 축적이 가장 잘 유도되고 섬유화가 가장 잘 유발되는 것을 확인하였다 (도 7C).

[0094] 이러한 결과들을 통해 탈세포 간 조직 유래 지지체와 멀티웰 디바이스가 결합된 간 오가노이드 배양 플랫폼을 최적의 플랫폼으로 선별하고 추후 NASH 유발 실험에 이용하였다.

[0096] **실험예 2-3. 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델 구축을 위한 최적화된 배양 플랫폼 선별 (3)**

[0097] 비알콜성 지방간염(NASH)을 간 오가노이드에 유발해 주었을 때, 최적의 그룹으로 선택한 LEM-Chip 조건에서 다른 배양조건에 비해 염증성 사이토카인의 분비량 및 다양성이 증가하는지 확인하기 위해 염증성 사이토카인에 대한 면역항체 어레이를 진행하였다. 인간 조직 유래 간 오가노이드를 대조군인 MAT 지지체에서 배양한 Normal 그룹과 NASH 유발 그룹, LEM 배양 조건과 LEM-Chip 조건에서 배양하면서 NASH를 유발한 그룹에 대하여 분석을 진행하였다.

[0098] 40가지의 염증성 사이토카인에 대하여 면역항체 어레이를 진행했을 때, 분비량이 높게 검출된 주요 염증성 사이토카인 7개에 대하여 정량 분석을 진행하였다. 그 결과 7개의 사이토카인(MIP-1 β , sTNF RI, RANTES, TIMP-2, IL-11, MCP-1, IL-8)은 Normal 그룹에 비해 NASH를 유발한 그룹에서 증가하는 경향을 보이며, 특히 LEM-Chip에서 배양한 NASH 오가노이드 그룹에서 염증성 사이토카인의 분비량이 가장 높게 검출되는 것을 확인하였다 (도 8). 이를 통해, 기존의 배양 플랫폼에서 지방간염을 유발하는 것 보다 본 발명에서 개발한 LEM 지지체와 미세유체 칩을 결합한 배양 플랫폼이 NASH 모델 유발에 가장 최적화된 플랫폼임을 확인하였다.

[0100] **실험예 2-4. 비알콜성 지방간염 (NASH) 유발에 최적화된 chip 기반 배양 플랫폼에서의 유체 이동 시뮬레이션**

[0101] 배양액에 유리 지방산을 처리하여 비알콜성 지방간염(NASH)을 유발할 때 기존의 배양액 흐름이 없는 정적인 plate 조건에서 NASH를 유발했을 때보다 배양액 흐름이 존재하는 chip 조건에서 오가노이드 내부로의 지방산 흡수 촉진을 위한 chip 내의 유체 이동에 대한 예측 시뮬레이션을 진행하였다.

[0102] 비알콜성 지방간염 유발을 위해 제작된 chip 조건에 대해서 유체 시뮬레이션을 진행하여 시간에 따른 유체의 흐름을 예측하였다. 교반기에 의해 형성되는 흐름은 교반기의 움직임에 따라 유체의 속도 및 방향이 변하기 때문에 교반기의 속도 및 각도를 조절하면 기존 정적인 plate 조건의 배양 환경 보다 다양한 유체의 흐름을 제공할 수 있음을 확인하였다 (도 9). 이를 통해 유체 흐름이 없는 plate 환경에 비해서 배양액 흐름이 존재하는 동적인 chip 환경에서 배양액에 포함된 유리 지방산이 오가노이드 내부로 더욱 효율적으로 전달될 수 있을 것으로 예측되었다.

[0104] **실험예 2-5. 비알콜성 지방간염 (NASH) 유발에 최적화된 chip 기반 배양 플랫폼에서의 지방산 흡수 시뮬레이션**

[0105] 배양액에 유리 지방산을 처리하여 비알콜성 지방간염(NASH)을 유발할 때, 기존의 배양액 흐름이 없는 정적인 plate 조건에서 NASH를 유발했을 때보다 배양액 흐름이 존재하는 chip 조건에서 오가노이드 내부로의 지방산 흡수가 보다 효율적으로 일어날 수 있는지를 확인하기 위해 각 조건에서의 지방산 흡수 예측 시뮬레이션을 진행하였다.

[0106] 기존 정적인 well plate 조건과 동적인 chip 조건에 대한 유체의 흐름 및 물질 이동 시뮬레이션을 통하여 오가노이드의 지방산 흡수를 60분 동안 예측하였다. 그 결과, 동적 chip 배양 시스템에서는 유체의 흐름을 통하여 배양액에 포함된 유리 지방산 이동 및 교환이 촉진되며, 따라서 정적 배양 시스템인 well plate 조건에 비해서 오가노이드 내부로의 지방산 흡수가 빠르게 증가함을 확인하였다 (도 10).

[0108] **실험예 3: 간 조직 특이적 미세환경 세포의 공배양을 통한 오가노이드 분화 증진 효과 확인**

[0109] **실험예 3-1. 간 조직 미세환경이 통합된 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 위한 쿠퍼세포 (Kupffer cell) 분화**

[0110] 쿠퍼세포는 간에 존재하는 면역세포로서 비알코올성 지방간 유도에 있어 염증성 쿠퍼세포가 활성화되면 사이토

카인 및 활성산소종 (ROS)을 분비하는 등 질환 표현형에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, 이러한 간 조직 미세환경이 구비된 NASH 모델 제작을 위해 간 오가노이드와 함께 공배양 할 수 있는 쿠퍼세포를 인간 유도만능줄기세포로부터 분화하였다.

[0111] 그 결과 인간 유도만능줄기세포로부터 EB (Embryoid body)를 제작한 뒤, 대식세포 전구체 (macrophage precursor) 단계를 거쳐 쿠퍼세포로 분화한 것을 확인하였다 (도 11A).

[0112] 그리고 제작된 쿠퍼세포의 단백질 마커 발현을 면역염색을 통해 분석하였을 때, 단핵세포 (monocyte) 및 M2 면역세포 마커인 F4/80, CD163과 쿠퍼세포 관련 마커인 CD34의 발현이 잘 되는 것을 확인하였다 (도 11B).

[0114] **실험예 3-2. 간 조직 미세환경이 통합된 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 위한 간 성상세포 (hepatic stellate cell; HSC) 분화**

[0115] 비알코올성 지방간 염증 발현에 있어서 간 성상세포가 활성화되면서 중요한 섬유성 인자들을 분비하는 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 이러한 간 조직 미세환경이 구비된 NASH 모델 제작을 위해 간 오가노이드와 공배양 할 수 있는 간 성상세포를 인간 유도만능줄기세포로부터 분화하였다.

[0116] 그 결과 인간 유도만능줄기세포로부터 중배엽, 중피세포를 거쳐 간 성상세포로 분화하였고 계대 배양이 가능함을 확인하였다 (도 12A).

[0117] 또한, 간 성상세포 분화 후 14일에 면역염색을 통해 마커 발현을 확인하였을 때, 간 성상세포에 의해 분비되는 세포외기질 (ECM) 마커인 COL1, FN과 성상세포 분화 마커인 Vimentin, α-SMA이 잘 발현한 것을 확인하였다 (도 12B).

[0119] **실험예 3-3. 인간 조직 유래 간 오가노이드의 미세환경 세포 공배양 유무에 따른 간 분화 및 기능성 비교**

[0120] 실제 간에 존재하는 혈관내피세포(EC), 쿠퍼세포(KC) 및 간 성상세포(HSC)를 인간 조직 유래 정상 간 오가노이드(Liver organoid; LO)와 공배양 했을 때, 간 오가노이드의 간 분화 마커 및 기능성 향상 여부를 확인하기 위해 매트릭젤(MAT)에서 배양된 간 오가노이드와 탈세포 간 조직 유래 지지체(LEM)에서 배양된 간 오가노이드에 이들 세포들을 같이 포함하여 배양하였다. 미세환경 세포를 공배양하지 않은 그룹은 대조군으로 적용하였다. 혈관내피세포는 HUVEC(Human umbilical vein endothelial cells)을 이용하고 쿠퍼세포 및 간 성상세포는 앞서 인간 유도만능줄기세포(iPSC)에서 분화한 세포를 이용하였다. 간 오가노이드가 배양되는 30 mL MAT 또는 LEM 하이드로젤에 혈관내피세포 25,000 cells, 쿠퍼세포 25,000 cells, 간 성상세포 20,000 cells 추가하여 공배양하고 3일 뒤에 정량적 PCR 및 요소합성능 분석을 진행하였다.

[0121] 대조군 매트릭젤과 탈세포 LEM 하이드로젤 지지체에서 배양된 인간 간 오가노이드에 혈관세포, 간 성상세포와 쿠퍼세포를 공배양 하였을 때 두 그룹 모두에서 간 오가노이드 주변에 미세환경 세포들이 함께 분포하며 공배양 이 가능함을 확인하였다 (도 13A).

[0122] 그리고, 정량적 PCR 분석을 통해 간 분화 마커의 발현을 비교했을 때, LEM 하이드로젤에서 배양된 간 오가노이드의 간 분화 마커 발현이 매트릭젤 그룹에 비해 우수하며, 미세환경 세포들이 포함된 공배양 그룹이 그렇지 않은 그룹에 비해 분화능이 더욱 향상된 것을 확인하였다 (도 13B).

[0123] 또한, 대표적인 간 기능성 지표인 요소합성 능력에 대한 분석을 통해 간 기능성을 비교했을 때에도 마찬가지로 LEM 하이드로젤에서 배양된 간 오가노이드의 요소합성 능력이 대조군 매트릭젤 그룹에 비해 우수하며 미세환경 세포들이 포함된 공배양 그룹이 그렇지 않은 그룹에 비해 요소합성 능력이 더욱 향상된 것을 확인하였다 (도 13C). 이를 통해 LEM 하이드로젤 조건에서 간 조직 특이적 미세환경이 통합된 간 오가노이드 모델이 가장 우수한 간 분화 및 기능성을 지님을 알 수 있다.

[0125] **실험예 3-4. 인간 iPSC 유래 간 오가노이드의 미세환경 세포 공배양 유무에 따른 간 분화 및 기능성 비교**

[0126] 기존의 iPSC 유래 간 오가노이드 제작 시 포함되는 iPSC 유래 간세포(H), 혈관내피세포(E), 중간엽줄기세포(M) 이외에 실제 간에 추가적으로 존재하는 쿠퍼세포(K) 및 간 성상세포(S)를 추가적으로 공배양 하였을 때, 간 분화 마커 및 기능성 향상 여부를 확인하기 위해 탈세포 간 조직 유래 지지체(LEM)에서 배양된 인간 iPSC 유래 간

오가노이드(HEM)에 이들 미세환경 세포들을 추가적으로 같이 포함하여 공배양 하였다(HEMKS). 구체적으로 공배양된 간 오가노이드(H:E:M:K:S)의 경우 10:7:2:2:1의 비율로 총 400,000개의 세포를 혼합하여 오가노이드를 제작하였다. 이러한 미세환경 세포들을 공배양 하지 않은 그룹(HEM)은 대조군으로 적용하였다. 쿠퍼세포 및 간 성상세포는 앞서 인간 iPSC에서 분화한 세포를 이용하였다. 공배양하고 5일 뒤에 면역염색과 정량적 PCR을 통해 HEM 그룹과 HEMKS 그룹에 대한 비교를 진행하였다.

[0127] 그 결과, 쿠퍼세포 마커인 CD68과 간 성상세포 마커인 PDGFRB, GFAP, FN, SMA에 대하여 면역염색을 진행했을 때, HEM 오가노이드에서는 각 미세환경 세포의 마커들이 발현되지 않는 반면, HEMKS 오가노이드에서는 해당세포 특이적인 마커들이 발현하는 것을 확인하였다 (도 14A). 특히, 쿠퍼세포와 간 성상세포에 의해 간 분화 마커의 발현도 더욱 증진되는지 확인하기 위해 SOX17, AFP, ALB 발현을 비교했을 때 쿠퍼세포와 간 성상세포를 함께 공배양 한 HEMKS 그룹에서 간 분화 마커의 발현 또한 증가된 것을 확인하였다.

[0128] 그리고, 정량적 PCR 분석을 통해 간 특이적인 미세환경이 구축된 HEMKS 오가노이드 그룹과 미세환경 세포가 부재한 HEM 오가노이드 그룹에 대하여 각 마커 유전자 발현을 비교했을 때, 간 분화 마커(HNF4A, ALB)의 발현이 HEMKS 오가노이드에서 유의미하게 증가한 것을 확인하였다 (도 14B). 또한, HEMKS 오가노이드의 경우 기존 HEM 오가노이드에 비해서 간 성상세포가 추가되었기 때문에 성숙한 간 성상세포에서 주로 발현하는 마커인 PDGFRB, COL1A1의 발현이 HEMKS 그룹에서 증가한 것을 확인하였다. 기존 HEM 오가노이드에 존재하는 혈관세포의 경우에도, 미세환경 세포들을 추가로 공배양한 HEMKS 오가노이드에서 10배 이상 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[0129] 이러한 결과를 통해, 간 조직 특이적 미세환경이 통합된 간 오가노이드 모델이 기존 간 오가노이드 모델에 비해 더 높은 간 분화 및 기능성을 지닐 수 있으며, 따라서 간 미세환경이 통합된 오가노이드에서 비알콜성 지방간염 모델링을 진행하면 더욱 정확한 질환 표현형을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

[0131] 실험예 4: 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델을 이용한 약물 유효성 평가

[0132] 실험예 4-1. 인간 조직 유래 비알콜성 지방간염 오가노이드를 이용한 약물 유효성 평가 (1)

[0133] 탈세포 간 조직 유래 LEM 지지체와 멀티웰 미세유체 디바이스가 결합된 배양 조건에서 간 조직 미세환경[혈관(E)+쿠퍼세포(K)+간 성상세포(S)]이 구축된 간 오가노이드에 지방간염(NASH)을 유발하고 Obeticholic acid (OCA) 약물을 농도별로 처리하였다. OCA (Obeticholic acid) 약물은 반합성 담즙산 유사체로서 기존에 담관염 치료에 이용되던 약물로 최근 비알콜성 지방간염 임상에서 효능이 검증되고 있는 약물 후보군이다. NASH 그룹은 지방산을 800 μ M 농도로 3일 동안 처리하여 질환을 유발하고 NASH + OCA 약물 그룹은 800 μ M 지방산과 해당 약물을 농도별로 3일 동안 처리하였다.

[0134] 그 결과, 정상 그룹의 오가노이드(Normal)에 비해 지방간 오가노이드(NASH)는 내부에 지방축적이 일어나며 오가노이드 특이적인 형태와 구조가 손상되는데 비해서, Obeticholic acid 약물을 처리한 그룹에서는 농도가 증가함에 따라 오가노이드의 모양과 구조가 회복되고 축적된 지방의 양이 줄어드는 것을 확인하였다 (도 15A).

[0135] 그리고, 약물 농도에 따른 세포 독성을 평가하기 위해 약물이 처리된 정상 간 오가노이드의 생존율 (viability) 분석을 진행했을 때, 1 μ M에서는 80% 이상, 10 μ M에서는 70%, 100 μ M 농도 조건에서는 60% 정도의 생존율을 보이는 것을 확인하였다 (도 15B). 즉, OCA 처리 농도가 증가함에 따라 간 독성은 증가하는 것으로 확인되었다.

[0136] 또한, 정량적 PCR 분석을 통해 유효약물의 처리 농도별로 질환 마커 유전자 발현을 비교했을 때, 염증 관련 마커(TNF α)와 섬유화 관련 마커(SMA)의 발현이 지방간 오가노이드 그룹(NASH)에서 증가하고 OCA 약물을 처리해 주면 감소하는 것을 확인하였다. 하지만 100 μ M 약물 농도에서는 오히려 약물독성에 의해 염증 마커와 섬유화 관련 마커의 발현이 더 증가하는 것을 확인하였다 (도 15C).

[0137] 이러한 결과를 통해 LEM-Chip 배양 조건에서 EC, HSC, KC 세포와 공배양된 NASH 간 오가노이드 모델은 약물의 유효성 및 독성 평가를 위한 비알콜성 지방간염 체외모델로서 적용 가능성이 검증되었다.

[0139] 실험예 4-2. 인간 조직 유래 비알콜성 지방간염 오가노이드를 이용한 약물 유효성 평가 (2)

[0140] 탈세포 간 조직 유래 LEM 지지체와 멀티웰 미세유체 디바이스가 결합된 배양 조건에서 간 조직 미세환경[혈관(E)+쿠퍼세포(K)+간 성상세포(S)]이 구축된 간 오가노이드에 지방간염(NASH)을 유발하고 Ezetimibe (Eze) 약물을 농도별로 처리하였다. Eze (Ezetimibe) 약물은 콜레스테롤 흡수 억제제로서 기존에 고혈당 콜레스테롤 및

지질 이상 치료에 사용되던 약물 후보군이다. NASH 그룹은 지방산을 800 μM 농도로 3일 동안 처리하여 질환을 유발하고 NASH + Eze 약물그룹은 800 μM 지방산과 해당 약물을 농도별로 3일 동안 처리하였다.

[0141] 그 결과, 정상 그룹의 오가노이드(Normal)에 비해 지방간 오가노이드(NASH)는 내부에 지방축적이 일어나며 오가노이드 특이적인 형태와 구조가 손상되는데 비해서, Ezetimibe 약물을 처리한 그룹에서는 농도가 증가함에 따라 오가노이드의 모양과 구조가 회복되고 축적된 지방의 양이 줄어드는 것을 확인하였다 (도 16A).

[0142] 그리고, 약물 농도에 따른 세포 독성을 평가하기 위해 약물이 처리된 정상 간 오가노이드의 생존율 (viability) 분석을 진행했을 때, 1-10 μM 조건에서는 70% 이상, 100 μM 농도 조건에서는 50% 정도의 생존율을 보이는 것을 확인하였다 (도 16B).

[0143] 또한, 정량적 PCR 분석을 통해 유효약물의 처리 농도별로 질환 마커 유전자 발현을 비교했을 때, 염증 관련 마커(TNF α)와 섬유화 관련 마커(SMA)의 발현이 지방간 오가노이드 그룹(NASH)에서 증가하고 Ezetimibe 약물을 처리해주면 감소하는 것을 확인하였다. 10 μM 농도 이상 처리되었을 때 정상 오가노이드와 유사한 수준으로 염증 및 섬유화 마커 발현이 감소함을 확인하였다 (도 16C).

[0144] 이러한 결과를 통해 LEM-Chip 배양 조건에서 EC, HSC, KC 세포와 공배양된 NASH 간 오가노이드 모델은 약물의 유효성 및 독성 평가를 위한 비알콜성 지방간염 체외모델로서 적용 가능성이 검증되었다.

[0146] 실험예 4-3. 인간 조직 유래 비알콜성 지방간염 오가노이드를 이용한 약물 유효성 평가 (3)

[0147] 탈세포 간 조직 유래 LEM 지지체와 멀티웰 미세유체 디바이스가 결합된 배양 조건에서 간 조직 미세환경[혈관(E)+쿠퍼세포(K)+간 정상세포(S)]이 구축된 간 오가노이드에 지방간염(NASH)을 유발하고 Dapagliflozin (DAPA) 약물을 농도별로 처리하였다. DAPA (Dapagliflozin) 약물은 sodium-glucose transporter 억제제로서 기존에 당뇨병 치료에 사용되던 약물 후보군이다. NASH 그룹은 지방산을 800 μM 농도로 3일 동안 처리하여 질환을 유발하고 NASH + DAPA 약물그룹은 800 μM 지방산과 해당약물을 농도별로 3일 동안 처리하였다.

[0148] 그 결과, 정상 그룹의 오가노이드(Normal)에 비해 지방간 오가노이드(NASH)는 내부에 지방축적이 일어나며 오가노이드 특이적인 형태와 구조가 손상되는데 비해서, Dapagliflozin 약물을 처리한 그룹에서는 농도가 증가함에 따라 오가노이드의 모양과 구조가 회복되고 축적된 지방의 양이 줄어드는 것을 확인하였다 (도 17A).

[0149] 그리고, 약물 농도에 따른 세포 독성을 평가하기 위해 약물이 처리된 정상 간 오가노이드의 생존율 (viability) 분석을 진행했을 때, 1 μM 농도까지는 생존율에 영향을 미치지 않고 10 μM 조건에서는 80% 이상, 100 μM 농도 조건에서는 60% 정도의 생존율을 보이는 것을 확인하였다 (도 17B).

[0150] 또한, 정량적 PCR 분석을 통해 유효약물의 처리 농도별로 질환 마커 유전자 발현을 비교했을 때, 염증 관련 마커(TNF α), 섬유화 관련 마커(SMA), 지방축적 마커(PLIN2)와 간 정상세포 활성화 마커(PDGFRB) 모두 지방간 오가노이드 그룹(NASH)에서 증가하고 DAPA 처리 농도에 따라 감소하는 것을 확인하였다. 간 분화 마커인 ALB 발현의 경우 지방간 오가노이드 그룹(NASH)에서 감소했다가 DAPA 약물을 처리해주면 다시 기능성을 회복하는 것을 확인하였다 (도 17C).

[0151] 이러한 결과를 통해 LEM-Chip 배양 조건에서 EC, HSC, KC 세포와 공배양된 NASH 간 오가노이드 모델은 약물의 유효성 및 독성 평가를 위한 비알콜성 지방간염 체외모델로서 적용 가능성이 검증되었다.

[0153] 실험예 5: 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 기반 선별된 유효약물의 기전 규명 및 효과

[0154] 실험예 5-1. 인간 조직 유래 간 오가노이드 기반 비알콜성 지방간염 모델에서의 약물 유효성 검증

[0155] LEM-Chip 배양 플랫폼에서 간 미세환경이 통합된 인간 조직 유래 간 오가노이드 모델에 NASH를 유발한 뒤, 앞서 선별한 dapagliflozin(DAPA) 약물을 처리했을 때 지방간염 치료 효과가 있는지 확인하기 위한 분석을 진행하였다. NASH 질환모델을 제작 시 혈관세포(E), 쿠퍼세포(K), 간 정상세포(S)의 필요성을 추가로 검증하기 위해 미세환경 세포가 공배양 되지 않은 오가노이드 모델을 대조군으로 이용하였다.

[0156] 그 결과, 간 특이적인 미세환경 세포가 공배양 되어있지 않은 정상 오가노이드 그룹(Normal - EKS)과 공배양 되어있는 정상 그룹(Normal + EKS)에 대하여 면역염색을 실시하여 비교했을 때, 미세환경세포가 공배양된 오가노이드 그룹에서 쿠퍼세포 마커인 CD68과 간 정상세포 마커인 α -SMA를 발현하는 세포가 오가노이드 주변에 분포

하고 있는 것을 확인할 수 있다 (도 18A). 이들 세포가 공배양된 오가노이드 그룹에 NASH를 유발했을 때, 오가노이드 내부와 주변 미세환경 세포에도 일부 지방산이 축적되어 있는 것을 확인했으며, DAPA 약물을 처리해준 그룹에서는 지방산 축적이 감소한 것을 확인하였다. 또한, 간 정상세포 마커이며 동시에 간 섬유화 마커인 α -SMA의 경우에도 NASH + EKS 그룹에서는 오가노이드 내부와 주변 기질, 면역세포에서도 발현하는데 비해 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 α -SMA의 발현이 감소한 것을 확인하였다.

[0157] 그리고, 정량적 PCR 분석을 통해 미세환경이 구축된 그룹과 오가노이드만 배양된 그룹에 대하여 각각 NASH를 유발하여 공배양 세포(EKS) 유무에 따라 염증(IL-6, IL-1 β , TNF- α), 섬유화(SMA, COL1A1, TGF- β), 지방산 생합성(SREBPC1, FAS, ACC) 관련 유전자들의 발현을 비교했을 때, 공배양 세포가 포함되어 있지 않은 오가노이드에 NASH를 유발하면 염증, 섬유화 및 지방산 생합성 관련된 유전자 발현이 증가하지만, 공배양 세포가 포함된 오가노이드에 NASH를 유발했을 때에는 염증, 섬유화 및 지방산 생합성 관련 각 유전자들의 발현 증가폭이 더 큰 것을 확인할 수 있다 (도 18B). 또한, 공배양 세포가 없는 정상 오가노이드(Normal - EKS)에 비해 공배양 세포가 포함된 정상 오가노이드(Normal + EKS)는 기질세포 및 면역세포를 포함하고 있기 때문에 염증, 섬유화 및 지방산 생합성 유전자의 초기 발현 자체에서 차이를 보이기 때문에 공배양 세포가 없는 오가노이드에 NASH 모델을 유발하는 것은 염증, 섬유화 및 지방산 생합성 관련하여 정확하지 않은 정보를 제공할 수 있다. 또한, 미세환경이 통합된 NASH 오가노이드 모델에 DAPA 약물을 처리했을 때, 염증, 섬유화 및 지방산 생합성 관련된 유전자들의 발현이 감소하며 지방간염의 개선 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0158] 이러한 결과를 통해, 본 발명에서 개발한 LEM-Chip 기반 간 미세환경이 통합된 인간 조직 유래 NASH 오가노이드 모델이 기존 오가노이드 모델에 비해 보다 정확한 비알콜성 지방간염 질환 표현형을 제시할 수 있는 모델이며, 동시에 해당 모델 기반 신규 발굴한 DAPA 약물이 유효한 지방간염 치료 효과를 보이는 것을 입증하였다.

[0160] 실험예 5-2. 인간 iPSC 유래 간 오가노이드 기반 비알콜성 지방간염 모델에서의 약물 유효성 검증 (1)

[0161] LEM-Chip 플랫폼에서 배양된 인간 iPSC 유래 간 오가노이드(HEMKS) 지방간염 모델에서 Dapagliflozin (DAPA)의 약물 유효성을 검증하기 위하여 Normal 그룹, 5일 동안 800 μ M Oleic acid를 처리하여 NASH를 유발한 그룹과 800 μ M Oleic acid와 50 μ M DAPA를 함께 처리한 NASH + DAPA 그룹을 비교 분석하였다. NASH 오가노이드 모델에 대하여 염증반응, 섬유화, mTORC1 기전 관련 마커에 대한 면역염색과 western blot 분석을 진행하였다.

[0162] 그 결과, 면역염색을 통해 섬유화 관련 마커 SMA, 지방산 생합성 관련 마커 ACC, mTORC1 기전 관련 마커 p-S6, p-4EBP1의 발현을 비교했을 때, 정상 오가노이드에 비해 NASH 그룹에서 유의미하게 이러한 마커들이 증가하였으며 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 감소하는 양상을 보이는 것을 확인하였다 (도 19A). 쿠퍼세포 마커인 CD68 염색을 통해 NASH 그룹에서 염증반응이 많이 일어난 p-S6 마커가 과발현된 부분에 쿠퍼세포들이 주로 분포하고 있는 것을 확인하였다. 간 기능성 마커인 ALB과 축적된 지방산을 표지하는 BODIPY 염색을 통해 NASH 그룹에서는 축적된 지방산은 증가하며 ALB이 감소함을 확인하였으나 DAPA 약물을 처리해준 그룹에서는 지방산 축적이 감소하고 ALB 발현 증가를 통해 간 기능성이 개선된 것을 확인하였다.

[0163] 그리고, western blot 분석을 통해 각 마커 단백질 발현을 확인했을 때에도 섬유화 관련 마커(SMA, Col1A1), 염증 관련 마커(IL-1 β , p-IkB/IkB)와 mTORC1 관련 마커(p-4EBP1/4EBP1, p-p70S6K1/p70S6K1, p-S6/S6)의 발현이 NASH 오가노이드에서 증가하고 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 발현이 감소하는 양상을 확인하였다 (도 19B).

[0164] 이러한 결과를 통해, LEM-Chip 배양 조건에서 제작한 인간 iPSC 유래 NASH 오가노이드 모델에서 실제 지방간염과 비슷하게 염증, 섬유화 반응은 증가하는데 비해 신규 발굴한 DAPA 약물에 의해 염증반응, 섬유화 및 mTORC1 관련 단백질 발현이 정상과 비슷하게 회복되는 것을 입증하였다.

[0166] 실험예 5-3. 인간 iPSC 유래 간 오가노이드 기반 비알콜성 지방간염 모델에서의 약물 유효성 검증 (2)

[0167] LEM-Chip 플랫폼에서 배양된 인간 iPSC 유래 간 오가노이드(HEMKS) 지방간염 모델에서 Dapagliflozin (DAPA)의 약물 유효성을 검증하기 위하여 Normal 그룹, 5일 동안 800 μ M Oleic acid를 처리하여 NASH를 유발한 그룹과 800 μ M Oleic acid와 50 μ M DAPA를 함께 처리한 NASH + DAPA 그룹을 비교 분석하였다.

[0168] 그 결과, 오가노이드 내부에 섬유화로 인한 콜라겐 축적을 확인하기 위하여 Masson's Trichrome (MT) 염색을 진행했을 때, 정상 오가노이드 그룹에 비해 NASH 그룹에서 섬유화 동반에 따른 콜라겐 축적량이 유의미하게 증

가하고 DAPA를 처리해준 그룹에서 감소한 것을 조직학 염색 및 정량적 분석을 통해 확인하였다 (도 20A).

[0169] 그리고, 세포 내 축적된 지방산을 염색하는 Oil red O 염색을 통해서도 오가노이드 내부에 붉은색으로 염색되는 지방 축적이 유의미하게 증가하며 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 지방산 축적이 감소된 것을 확인하였다 (도 20B)

[0170] 이러한 결과를 통해, LEM-Chip 플랫폼에서 배양된 인간 iPSC 유래 간 오가노이드(HEMKS) 지방간염 모델에서 DAPA 약물의 효능 검증이 가능함을 확인하였다.

[0172] **실험예 5-4. 인간 조직 유래 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 이용한 유효 약물의 효능 비교 및 치료 기전 규명 (1)**

[0173] LEM-Chip 플랫폼에서 배양된 인간 조직 유래 간 오가노이드 지방간염(NASH) 모델에 Dapagliflozin (DAPA) 약물의 치료 기전을 규명하고 유효성을 검증하기 위하여 Normal 그룹, NASH를 유발한 그룹과 NASH + DAPA 그룹을 비교 분석하였다. 급성 NASH 모델의 경우 오가노이드에 3일간 800 μ M Oleic acid를 처리한 그룹과 3일간 800 μ M Oleic acid + 50 μ M DAPA 처리를 한 그룹으로 진행하였고, 만성 NASH 모델은 오가노이드에 5일간 800 μ M Oleic acid + 20 ng/ml TGF- β 를 처리한 그룹과 5일간 800 μ M Oleic acid + 20 ng/ml TGF- β + 50 μ M DAPA 처리를 한 그룹으로 진행하였다. 인간 조직 유래 급성 및 만성 NASH 오가노이드 모델에 대하여 염증반응, 섬유화, YAP/TAZ, mTORC1 기전 관련 마커들에 대한 western blot 분석을 실시하였다.

[0174] Western blot 분석을 통해 섬유화 마커 α -SMA, COL1A1, 염증 마커 p-IkB/IkB, pro-IL1 β , YAP/TAZ 기전 관련 마커 p-YAP/YAP과 mTORC1 기전 관련 마커 p-S6/S6, p-p70S6K1/p70S6K1, p-4EBP1/4EBP1 단백질 발현을 비교한 결과, 섬유화 및 염증반응 관련된 단백질의 경우, 정상 오가노이드에 비해 급성 및 만성 NASH 그룹 모두에서 단백질 마커의 발현이 유의미하게 증가하며 이는 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 감소하는 것을 확인하였다 (도 21A). 하지만, YAP/TAZ 기전 관련 단백질과 mTORC1 기전 관련 단백질들의 경우에, (1) 급성 NASH 오가노이드에서 발현이 증가하고 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 발현이 감소하는 반면, (2) 만성 NASH 오가노이드에서는 이들 단백질 발현이 현저히 감소하고 DAPA 약물에 의해서 정상과 비슷한 수준으로 다시 회복되는 것을 확인하였다.

[0175] 그리고, 3번의 반복실험을 통해 정량을 진행했을 때에도, 섬유화 및 염증반응 관련된 마커의 발현은 급성 및 만성 NASH 모델 모두에서 DAPA에 의해 현저히 감소함을 확인하였다 (도 21B). 하지만, YAP/TAZ 기전 관련 단백질과 mTORC1 기전 관련 단백질의 발현은 급성모델에서 증가하며 만성모델에서는 현저히 감소하는데 DAPA 약물에 의해 정상 오가노이드와 비슷하게 발현이 회복됨을 확인하였다.

[0176] 이러한 결과를 통해, 인간 조직 유래 오가노이드 모델에 급성 및 만성 비알콜성 지방간염을 유발했을 때, 급성 모델에서는 YAP/TAZ 및 mTORC1 관련된 단백질 발현이 증가하였고 만성 모델에서는 관련 단백질 발현이 감소하였는데 본 발명에서 신규 발굴된 유효 약물인 DAPA에 의해 과발현 또는 감소된 단백질 발현이 정상 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에서 구축된 인간 NASH 오가노이드 모델은 NASH 치료를 위한 유효 약물의 발굴뿐 아니라 해당 약물의 분자적 수준에서의 치료 기전을 규명하는 연구에도 활용될 수 있음이 검증된다.

[0178] **실험예 5-5. 인간 조직 유래 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 오가노이드 모델을 이용한 유효 약물의 효능 비교 및 치료 기전 규명 (2)**

[0179] LEM-Chip 플랫폼에서 배양된 인간 조직 유래 급성 및 만성 NASH 오가노이드 모델에 대하여 앞서 western blot 분석으로 확인한 단백질 발현 결과의 재현성을 확인하기 위해 간 기능성, 섬유화, mTORC1 기전 관련 마커에 대한 면역염색을 진행하였다.

[0180] LEM-Chip 플랫폼에서 배양된 인간 조직 유래 오가노이드 모델에 급성 및 만성 NASH를 효율적으로 유발하기 위하여 지방산 처리 농도, 처리 기간 및 섬유화 유발 사이토카인 처리 여부 등을 다르게 적용하여 최적화된 모델을 확립하였다. 급성 NASH 모델의 경우, 이전 조건과 같이 오가노이드에 3일간 800 μ M Oleic acid만을 처리하였고 만성 NASH 모델의 경우, 오가노이드에 5일간 800 μ M Oleic acid와 섬유화 사이토카인 20 ng/ml TGF- β 를 처리하여 유발하였다. DAPA 약물 테스트의 경우 급성 모델에 대해서는 3일간 800 μ M Oleic acid + 50 μ M DAPA를 처리하였고, 만성 모델에 대해서는 5일간 800 μ M Oleic acid + 20 ng/ml TGF- β + 50 μ M DAPA를 처리하여 진

행하였다 (도 22A).

- [0181] 인간 조직 유래 NASH 오가노이드 모델에 지방산을 3일동안 처리하여 유발한 급성 모델에 대하여 면역염색을 진행했을 때, 간 기능성 관련 마커인 AFP의 경우 NASH 오가노이드 모델에서 감소하다가 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 기능성이 일부 회복된 것을 확인할 수 있으며, 섬유화 관련 α -SMA 마커의 경우 NASH 유발 그룹에서 발현이 증가하며 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 감소하는 것을 확인하였다. mTORC1 기전 관련 p-S6와 p-P70S6K1의 발현을 비교했을 때, 정상 오가노이드에 비해 급성 NASH 모델에서는 증가하며 DAPA 약물에 의해 감소하는 것을 확인하였다 (도 22B).
- [0182] 인간 조직 유래 NASH 오가노이드 모델에 지방산과 TGF- β 를 5일동안 처리하여 유발한 만성 모델에 대하여 면역염색을 진행했을 때, 간 기능성 관련 마커인 AFP의 경우 NASH 오가노이드 모델에서 감소하다가 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 기능성이 일부 회복된 것을 확인할 수 있으며, 섬유화 관련 α -SMA 마커의 경우 NASH 유발 그룹에서 발현이 증가하며 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 급성 보다 만성으로 유발한 NASH 모델에서 α -SMA 마커 발현이 크게 증가한 것을 확인할 수 있다. mTORC1 기전 관련 p-S6와 p-P70S6K1의 발현을 비교했을 때, 정상 오가노이드에 비해 만성 NASH 모델에서는 감소하며 DAPA 약물에 의해 발현이 회복되는 것을 확인하였다 (도 22C).
- [0183] 이러한 결과를 통해, 인간 조직 유래 오가노이드 모델에 급성 및 만성 비알콜성 지방간염을 유발했을 때, western blot 분석 결과와 동일하게 급성 모델에서는 mTORC1 관련 단백질 발현이 증가하며 만성 모델에서는 관련 단백질 발현이 감소하는 것이 관찰되었고 신규 발굴된 유효 약물인 DAPA에 의해 과발현 또는 감소된 단백질 발현이 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였다.
- [0185] **실험예 6: 비알콜성 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델에서 발굴된 신규 치료 약물의 유효성 평가 및 관련 기전 검증 (NASH 동물모델에서 약물의 효능 평가 및 기전 연구)**
- [0186] **실험예 6-1. 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 DAPA 약물 유효성 검증 (1)**
- [0187] 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델을 통해 발굴되고 NASH 치료 효능이 검증된 Dapagliflozin (DAPA) 약물이 실제 NASH 동물모델에서도 효과가 있는지 확인하기 위하여 초기 비알콜성 지방간염을 마우스에 유발하고 DAPA 약물을 5 mg/kg의 농도로 day 2에 1회 투여하였다.
- [0188] 본 실험에서 유발한 Fa/R (Fasting overnight, refed with high-carbohydrate, fat-free diet) 모델은 실제 비알콜성 지방간염 환자의 지방산 생합성 과정(De novo lipogenesis)을 잘 모사할 수 있는 모델로서 하룻동안 사료 급여를 하지 않은 뒤, 고탄수화물/무지방 사료로 나머지 하룻동안 급성으로 지방간염을 유발하는 모델이다. DAPA 약물은 Fa/R 사료를 투여하는 시점에 경구 투여로 5 mg/kg의 농도로 1회 투여하였다 (도 23A).
- [0189] 정상, Fa/R, Fa/R + DAPA 그룹의 마우스로부터 간 조직을 수거하고 H&E 염색과 MT 염색을 진행했을 때, Fa/R 그룹의 간 조직에 지방산 축적이 많이 관찰되었으며 섬유화 반응으로 인한 콜라겐이 내부에 축적된 것을 확인하였다. 이에 비해, DAPA 약물을 투여한 그룹은 지방산 축적이 감소하고 섬유화 증상이 개선되었다. 콜라겐이 염색된 면적을 정량 분석했을 때에도 DAPA 약물을 투여한 그룹의 간 조직에서 콜라겐 면적이 감소한 것을 확인하였다 (도 23B).
- [0190] 그리고, 3-Nitrotyrosine(3-NT)는 간에서 활성 산소종(reactive oxygen species)의 증가로 인해 축적되며 지방간염이나 섬유화가 일어난 간 조직에서 높게 발현되었다. DAPA 약물에 의한 산화 스트레스(oxidative stress) 감소 효과를 확인하기 위해 간 조직의 단백질 성분을 추출하여 3-NT 단백질에 대한 western whole blotting 분석을 진행했을 때, Fa/R 그룹에서는 3-NT 발현이 증가하는데 비해 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 유의미한 감소를 보임을 확인하였다 (도 23C).
- [0191] 간은 Lipopolysaccharide(LPS)를 해독하는 기능을 담당하는데 지방간이 유발되면 간세포의 기능이 떨어지면서 serum LPS 양이 증가하게 된다. 섬유화가 일어나면서 collagen 축적량이 증가하기 때문에 섬유화로 인해 증가된 collagen에 다량 존재하는 하이드록시프롤린(Hydroxyproline)의 경우에도 지방간염에 의한 섬유화의 지표로 사용된다. Serum LPS와 albumin은 day 3에 전혈 채혈을 통한 혈액 분석으로 측정하였으며 하이드록시프롤린은 해당 단백질에 대한 ELISA 분석을 통해 농도를 정량 하였다. 정상 그룹에 비해 Fa/R 그룹에서 LPS와 하이드록시프롤린의 양이 증가하며 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 감소하는 것을 확인하였다 (도 23D). Serum albumin의 경우 간 기능성의 지표로서 Fa/R 그룹에서 감소하며 DAPA 약물에 의해 회복되는 것을 확인할 수 있다.

- [0192] 이러한 결과를 통해, NASH 오가노이드 모델에서 효능이 검증된 DAPA 약물이 급성 초기 비알콜성 지방간염을 유발한 동물모델에서도 마찬가지로 효과가 있음이 검증되어 본 발명에서 구축된 NASH 오가노이드 모델이 지방간염 치료물질 발굴을 위한 체외모델로서 적용 가능함을 확인하였다.
- [0194] **실험예 6-2. 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 DAPA 약물 유효성 검증 (2)**
- [0195] 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델에서 효능이 검증된 Dapagliflozin (DAPA) 약물이 실제 NASH 동물모델에서도 효과가 있는지 확인하기 위하여 초기 비알콜성 지방간염을 마우스에 유발하고 약물을 경구 투여하였다 (5 mg/kg). 모델 유발 및 약물 투여가 종료된 Day 3에 분석을 진행하였다.
- [0196] 정상, Fa/R, Fa/R + DAPA 그룹의 마우스 간 조직에 대하여 세포사멸(apoptosis)을 검출하는 TUNEL 염색을 진행했을 때, Fa/R 그룹에서 TUNEL 세기가 증가하고 DAPA 약물에 의해 감소된 것을 확인함으로써 지방간염으로 인한 조직의 괴사가 DAPA 약물에 의해 저해됨을 확인하였다 (도 24A).
- [0197] DAPA 약물에 의한 산화 스트레스(oxidative stress) 감소 효과를 확인하기 위해 간 조직 내 3-Nitrotyrosine (3-NT) 단백질에 대한 면역조직화학염색 (immunohistochemistry; IHC) 분석을 진행했을 때에도, Fa/R 그룹에서 간세포의 팽창(ballooning)으로 인해 3-NT를 발현하는 세포가 증가하는데 비해 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 유의미한 감소를 확인하였다 (도 24B).
- [0198] 각 그룹의 간 조직에 대한 정량적 PCR 분석을 진행했을 때, 염증반응 관련 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현과 섬유화 관련 COL1A1, SMA, TGF- β 의 발현이 급성 NASH 모델인 Fa/R 그룹에서 증가하며 DAPA 약물에 의해 감소하는 것을 확인하였다 (도 24C).
- [0199] 혈액학 분석을 통해 간 독성 지표인 ALT를 분석했을 때에도 정상 마우스 그룹에 비해 Fa/R 모델에서 10배 정도 ALT가 증가하였는데 DAPA 약물에 의해 ALT 수치가 현저히 감소함을 확인하였다 (도 24D).
- [0200] 이러한 결과를 통해, NASH 오가노이드 모델에서 효능이 검증된 DAPA 약물이 급성 비알콜성 지방간염을 유발한 동물모델에서 효과가 있음을 검증하였다.
- [0202] **실시예 6-3. 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 DAPA 약물 유효성 검증 (3)**
- [0203] 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델에서 효능이 검증된 Dapagliflozin (DAPA) 약물이 실제 NASH 동물모델에서도 효과가 있는지 확인하기 위하여 병변이 심한 비알콜성 지방간염을 마우스에 유발하고 약물을 투여하였다.
- [0204] 본 실험에서 유발한 CDAHFD (Choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet) 모델은 비알콜성 지방간염이 심한 환자에서 섬유화를 동반하는 NASH-related fibrosis를 잘 모사할 수 있는 모델로서 8주 동안 콜린이 결핍된 고지방 식이로 만성적으로 지방간염을 유발하는 모델이다. DAPA 약물은 CDAHFD 식이 유발 후 4주가 되는 시점부터 일주일에 3회 투여 주기로 5 mg/kg의 농도로 경구 투여를 통해 주입하였다 (도 25A).
- [0205] 정상, CDAHFD, CDAHFD + DAPA 그룹의 마우스로부터 8주차에 수거된 간 조직에 대해서 H&E 염색과 MT 염색을 진행했을 때, CDAHFD 그룹에서 지방산 축적이 심하게 일어나며 섬유화 반응으로 인해 콜라겐이 내부에 과량 축적된 것을 확인하였다. 이를 통해 CDAHFD 모델이 앞선 Fa/R 모델에 비해 섬유화가 더 강하게 유발되는 모델임을 확인할 수 있다. 이에 비해, DAPA 약물을 투여한 그룹은 지방 축적이 감소하고 섬유화 증상이 개선된 것을 확인하였다. 콜라겐이 염색된 면적을 정량 분석했을 때에도 DAPA 약물을 투여한 그룹에서 유의미하게 감소한 것을 확인하였다 (cv: central vein, 중심정맥) (도 25B).
- [0206] 3-Nitrotyrosine(3-NT)는 간에서 활성산소종(reactive oxygen species)의 증가로 인해 축적되며 지방간염이나 섬유화가 일어난 간 조직에서 높게 발현되었다. DAPA 약물에 의한 산화 스트레스(oxidative stress) 감소 효과를 확인하기 위해 8주차에 간 조직의 단백질 성분을 추출하여 3-NT 단백질에 대한 western whole blotting 분석을 진행했을 때, CDAHFD 그룹에서 3-NT 발현이 증가하는데 비해 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 유의미하게 감소됨을 확인하였다 (도 25C).
- [0207] 앞선 Fa/R 모델과 마찬가지로 간 독성 지표인 serum LPS와 하이드록시프롤린의 양을 8주차에 확인했을 때, 정상 그룹에 비해 CDAHFD 그룹에서 serum LPS와 하이드록시프롤린의 양이 증가하였으며 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 감소하는 것을 확인하였다. Serum albumin의 경우 간 기능성 지표로서 CDAHFD 그룹에서 감소하며 DAPA 약물

에 의해 회복되는 것을 확인할 수 있다 (도 25D).

[0208] 이러한 결과를 통해, NASH 오가노이드 모델에서 효능이 검증된 DAPA 약물이 만성 비알콜성 지방간염을 유발한 동물모델에서도 마찬가지로 효과가 있음이 검증되어 본 발명에서 구축된 NASH 오가노이드 모델이 지방간염 치료 물질 발굴을 위한 체외모델로서 적용 가능함을 확인하였다.

[0210] **실험예 6-4. 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 DAPA 약물 유효성 검증 (4)**

[0211] 지방간염 (NASH) 오가노이드 모델에서 효능이 검증된 Dapagliflozin (DAPA) 약물이 실제 NASH 동물모델에서도 효과가 있는지 확인하기 위하여 병변이 심한 비알콜성 지방간염을 마우스에 유발하고 약물을 투여하였다. 약물은 4주차부터 5 mg/kg의 농도로 일주일에 3번 주기로 경구 투여하였다. 정량적 PCR 분석은 8주차 실험종료 시점에 진행하였다.

[0212] 8주차 실험종료 시점에 각 그룹에 대하여 간 조직의 크기를 확인하였을 때 CDAHFD 만성 비알콜성 지방간염 모델은 간 조직의 팽창(ballooning)이 심하게 일어나 부피가 커졌는데 DAPA 약물을 처리한 그룹의 간 조직의 경우에는 ballooning 현상이 감소된 것을 확인하였다 (도 26A).

[0213] 정상, CDAHFD, CDAHFD + DAPA 그룹의 마우스로부터 수거된 간 조직에 대하여 8주차에 정량적 PCR 분석을 진행했을 때, 염증반응 관련 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 발현과 섬유화 관련 COL1A1, SMA, TGF- β 의 발현이 만성 NASH 모델인 CDAHFD 그룹에서 증가하며 DAPA 약물에 의해 감소하는 것을 확인하였다 (도 26B).

[0214] 이러한 결과를 통해, NASH 오가노이드 모델에서 효능이 검증된 DAPA 약물이 급성 초기 NASH 또는 만성 NASH를 유발한 동물모델 모두에서도 지방간염 개선 효과가 있음이 검증되었다.

[0216] **실험예 6-5. 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 유효 약물의 효능 비교 및 치료 기전 규명 (1)**

[0217] 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델에서 유효성이 검증된 DAPA 약물이 앞서 급성 및 만성 NASH 간 오가노이드 모델에서 확인된 동일한 치료 기전에 따라 동물모델에서도 작용하는지 검증하기 위하여 western blot 분석과 이를 기반으로 마커 정량 분석을 실시하였다. 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델은 각각 Fa/R과 CDAHFD 사료로 유발한 모델을 사용하였다.

[0218] Western blot 분석을 통해 섬유화 관련 α -SMA, COL1A1, 염증 관련 p-IkB/IkB, pro-IL1 β , mTORC1 기전 관련 p-S6/S6, p-p70S6K1/p70S6K1, p-4EBP1/4EBP1의 발현을 비교했을 때, 정상 마우스의 간 조직에 비해 급성(Fa/R) 및 만성(CDAHFD) NASH 그룹의 간 조직 모두에서 섬유화 및 염증반응 관련 마커 단백질의 발현이 유의미하게 증가하였으며 DAPA 약물을 처리한 그룹에서는 해당 마커들의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. mTORC1 기전 관련 단백질들의 경우에는 급성 NASH 동물모델(Fa/R)에서는 발현이 증가하고 DAPA 약물을 처리한 그룹에서 감소하는 반면, 만성 NASH 동물모델(CDAHFD)에서는 mTORC1 관련 단백질 발현이 현저히 감소하고 DAPA 약물에 의해 정상과 비슷한 수준으로 회복되는 것을 확인하였다 (도 27A).

[0219] Western blot의 반복실험을 통한 정량분석을 진행하였을 때에도 급성 및 만성모델에서 섬유화 관련 단백질과 염증관련 단백질들의 양은 증가하며 DAPA약물에 의해 낮아지고, mTORC1 관련된 단백질의 경우 급성모델에서 증가한 발현량이 DAPA 약물에 의해 회복되었다. 이와는 반대로, 만성모델에서는 mTORC1 관련 단백질의 발현량이 현저히 감소하며 DAPA 약물에 의해 개선되었다. 다만, p-4EBP1/4EBP1의 경우 만성 NASH 오가노이드 모델에서와는 달리 만성 NASH 동물모델에서는 DAPA 처리에 의한 유의미한 감소가 관찰되지 않았다 (도 27B).

[0220] 이러한 결과를 통해, 인간 조직 유래 급성 및 만성 NASH 오가노이드 모델에서와 마찬가지로 급성 및 만성 NASH 동물모델에서도 신규 발굴된 유효약물인 DAPA의 mTORC1 관련 치료 기전이 대부분 일치하며 DAPA 약물에 의해 과발현 또는 감소된 단백질 발현이 정상 수준으로 회복되는 것을 확인하였다.

[0222] **실험예 6-6. 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델에서의 유효 약물의 효능 비교 및 치료 기전 규명 (2)**

[0223] 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델에서 DAPA 약물이 처리된 간 조직에 대해서 앞서 진행한 western blot 분석과 각 마커들에 대한 단백질 발현 양상이 일치하는지 확인하기 위해 간 조직에 대한 면역염색을 진행하였다. 급성 및 만성 비알콜성 지방간염 동물모델은 각각 Fa/R과 CDAHFD 사료로 유발한 모델을

사용하였다.

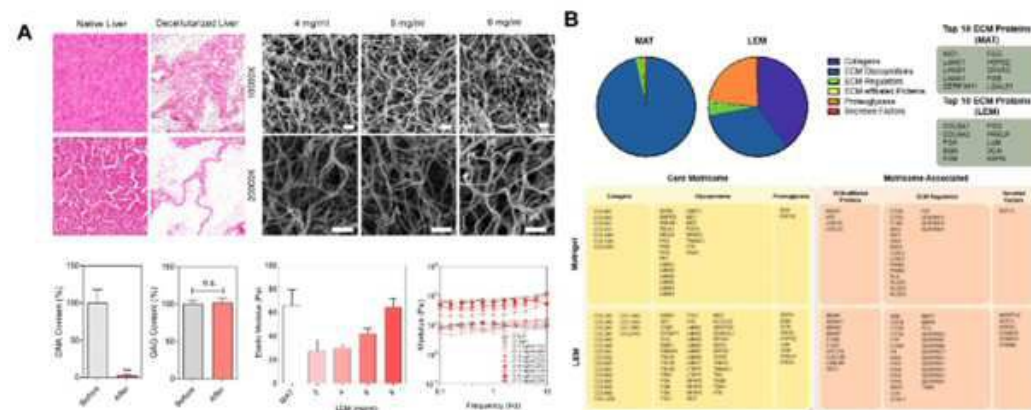
[0224] 면역염색을 통해 섬유화 관련 α -SMA를 염색했을 때, 정상 간 조직에 비해 Fa/R 및 CDAHFD 모델에서 발현이 증가하고 DAPA 약물에 의해 감소하는 것을 확인하였다. mTORC1 기전 관련 p-S6 단백질에 대한 염색을 통해, 앞서 검증한 바와 동일하게 급성 모델에서는 해당 마커가 증가하며 DAPA에 의해 감소하고, 만성 모델에서는 감소된 발현이 DAPA에 의해 회복되는 것을 확인하였다. 또 다른 mTORC1 기전 관련 p-4EBP1 단백질에 대한 면역염색을 통해 급성 및 만성 NASH 모델 모두에서 발현이 증가하지만 DAPA 약물에 의해 발현이 감소되는 양상을 확인하였다. 이는 앞서 확인한 western blot 분석 결과와 대체로 일치하는 결과이다 (도 28).

[0225] 따라서 인간 조직 유래 급성 및 만성 NASH 오가노이드 모델에서와 마찬가지로 급성 및 만성 NASH 동물모델에서도 신규 발굴된 유효약물인 DAPA의 mTORC1 관련 치료 기전이 대부분 일치하는 것을 면역염색 분석을 통해서도 확인하였다.

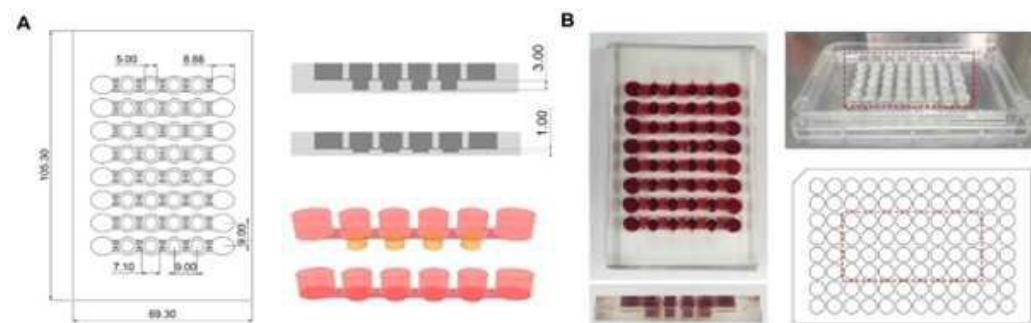
[0227] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

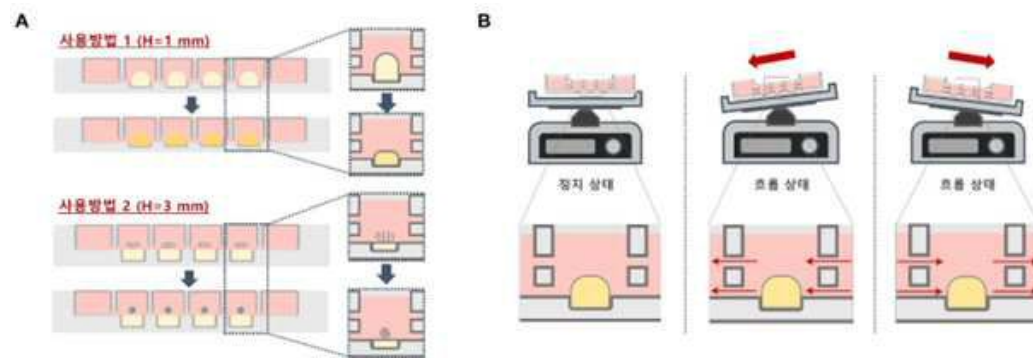
도면1



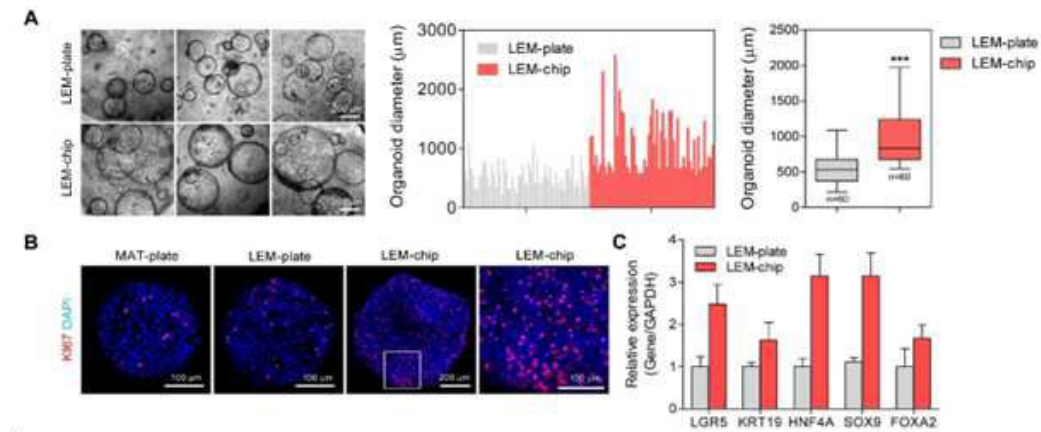
도면2



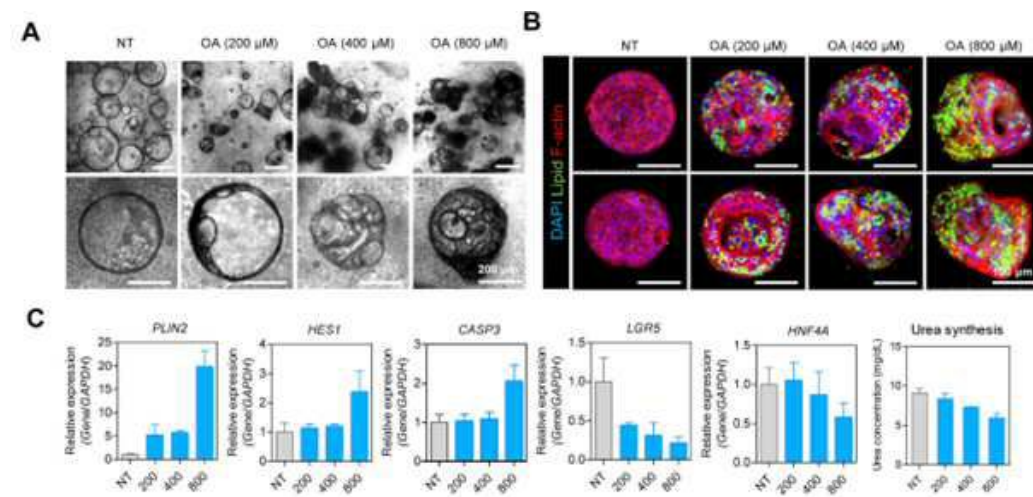
도면3



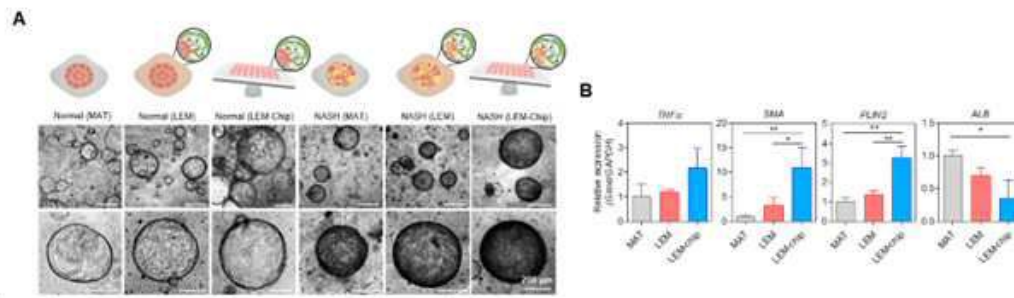
도면4



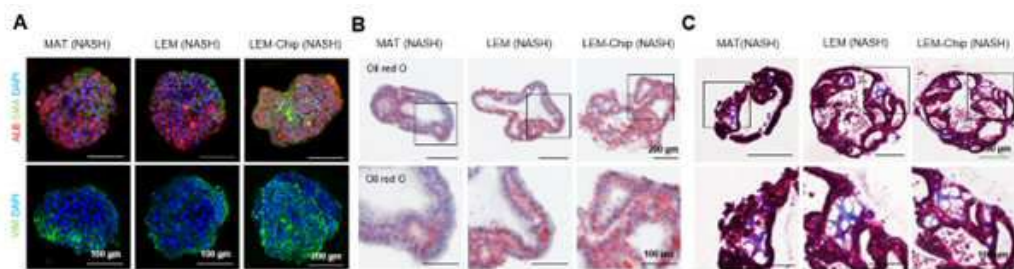
도면5



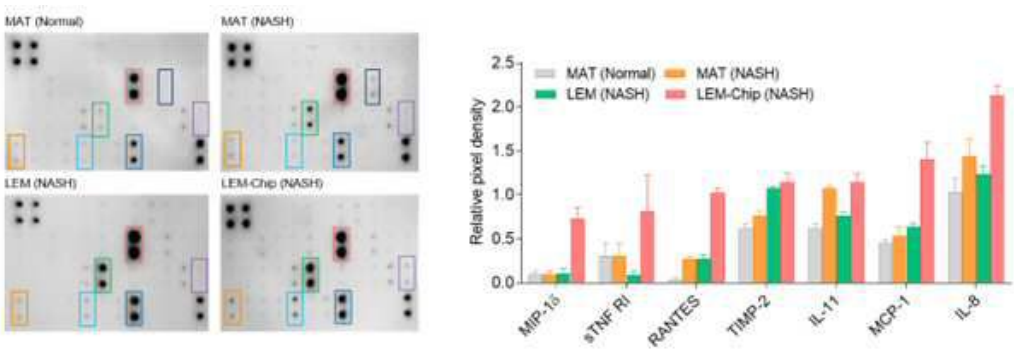
도면6



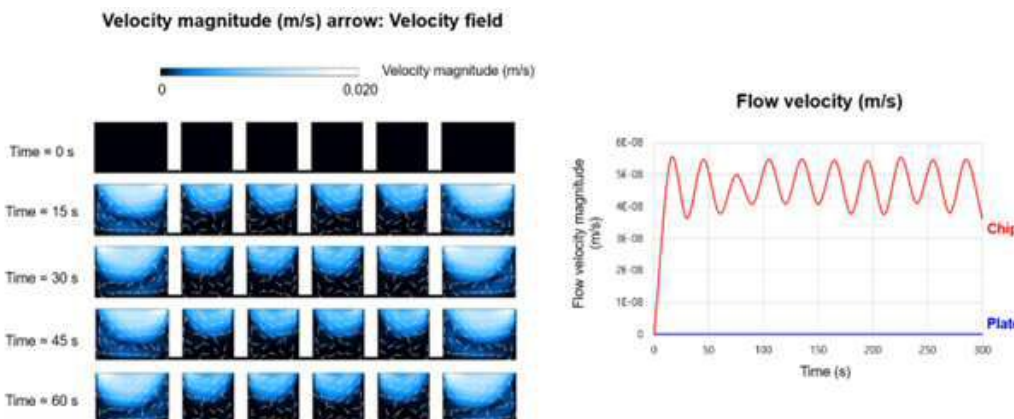
도면7



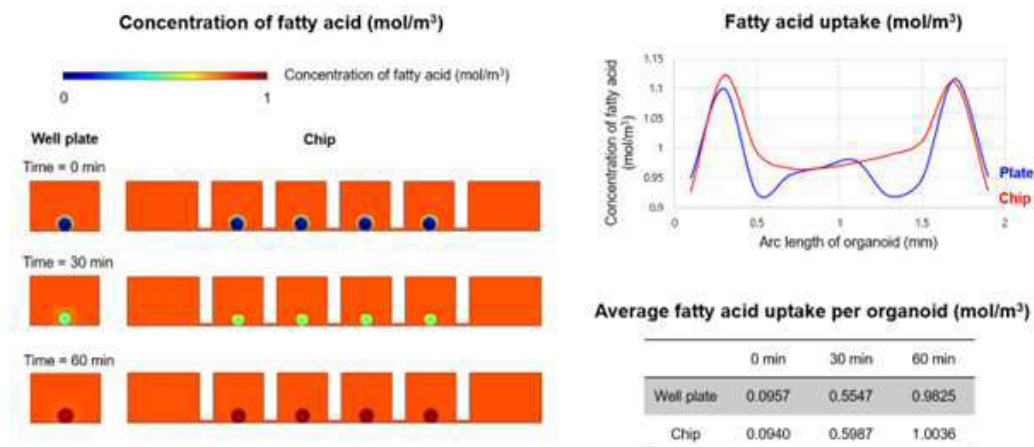
도면8



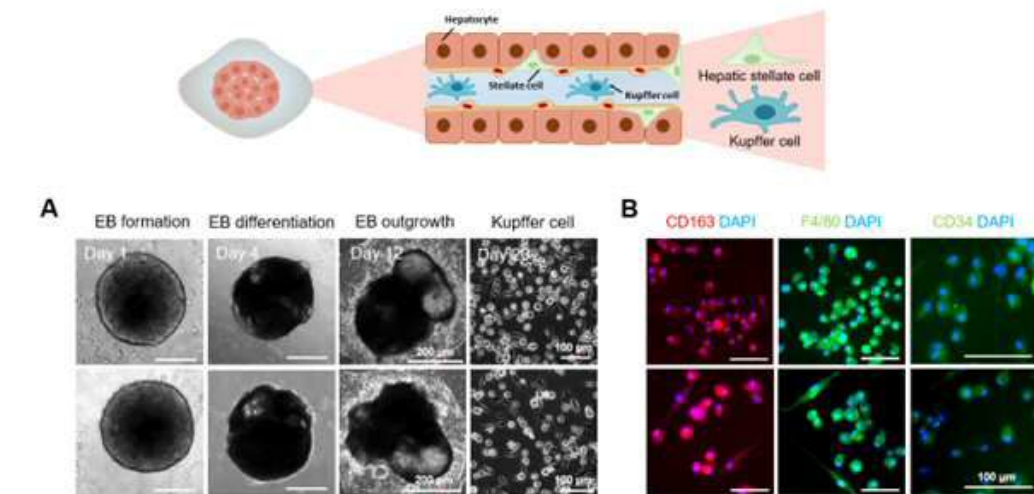
도면9



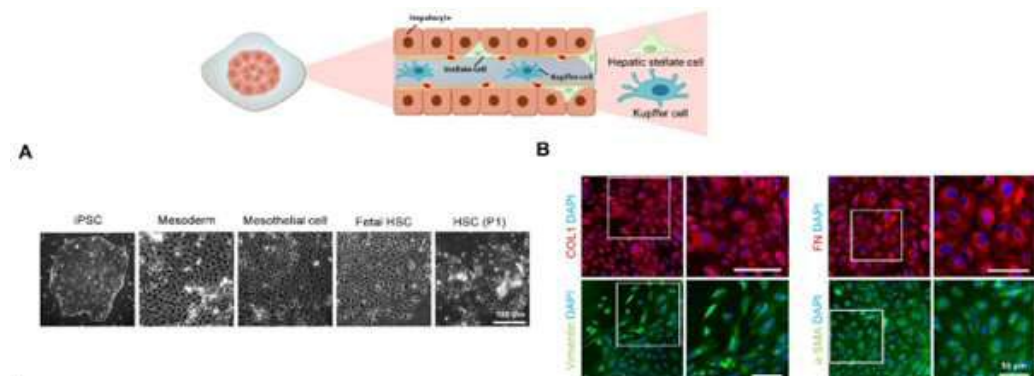
도면10



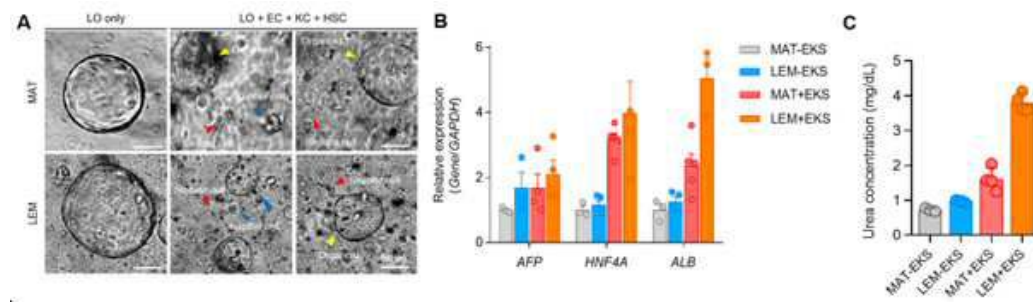
도면11



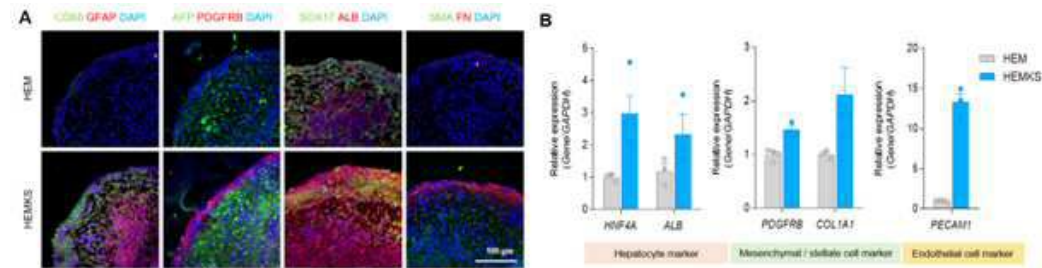
도면12



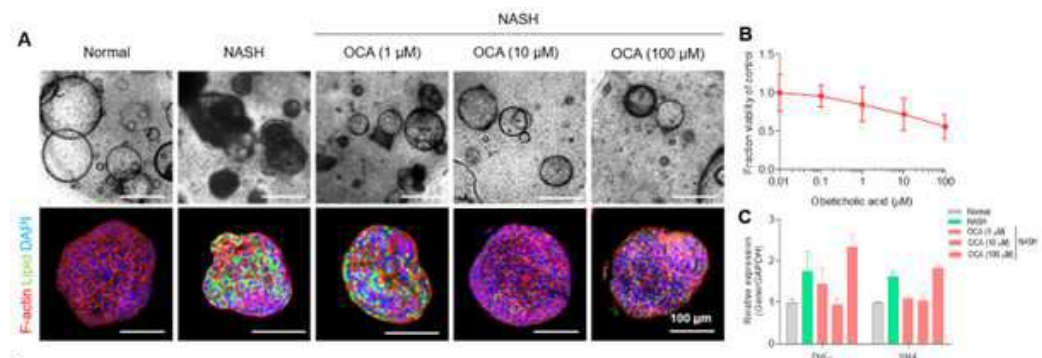
도면13



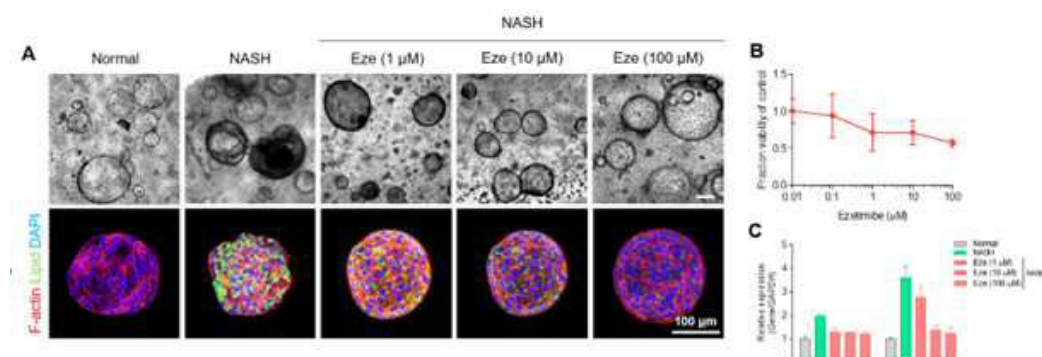
도면14



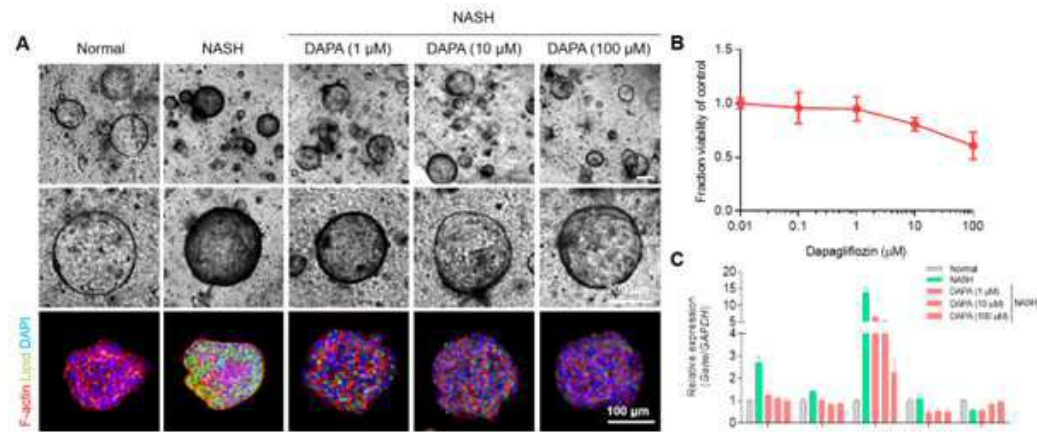
도면15



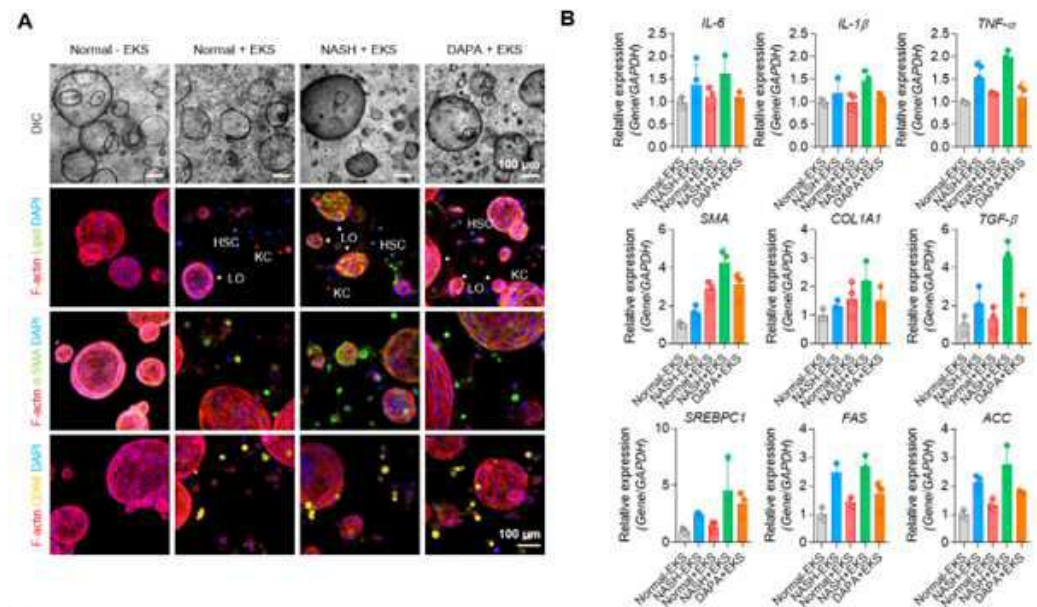
도면16



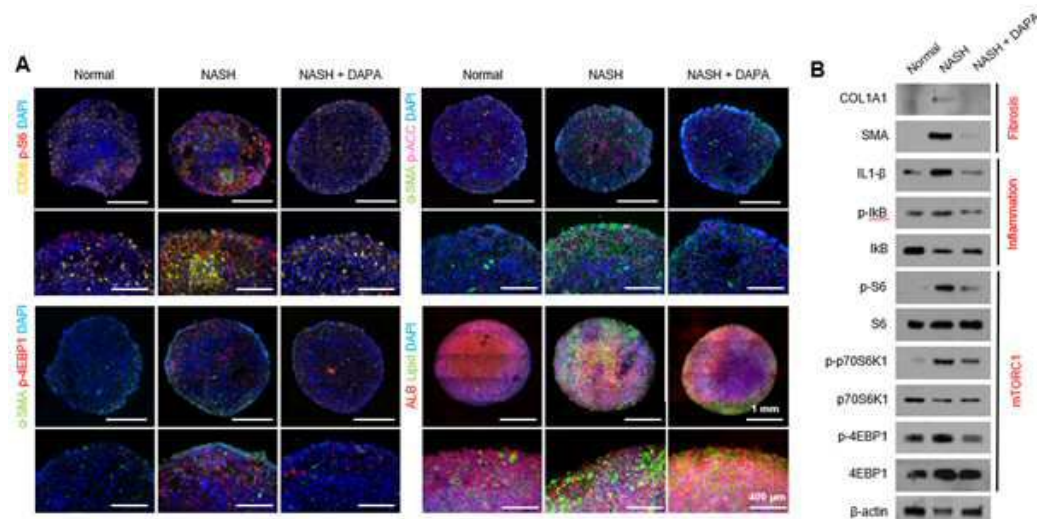
도면17



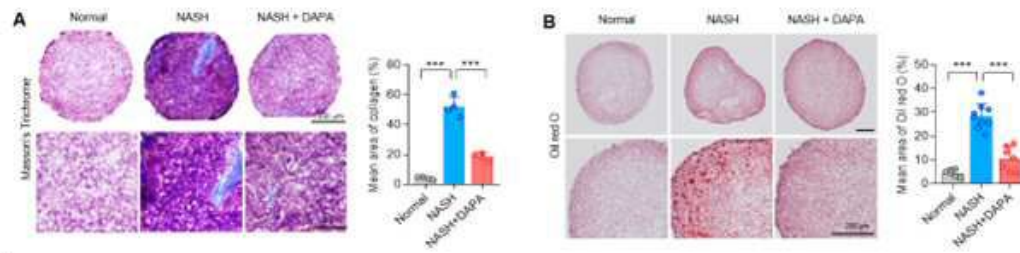
도면18



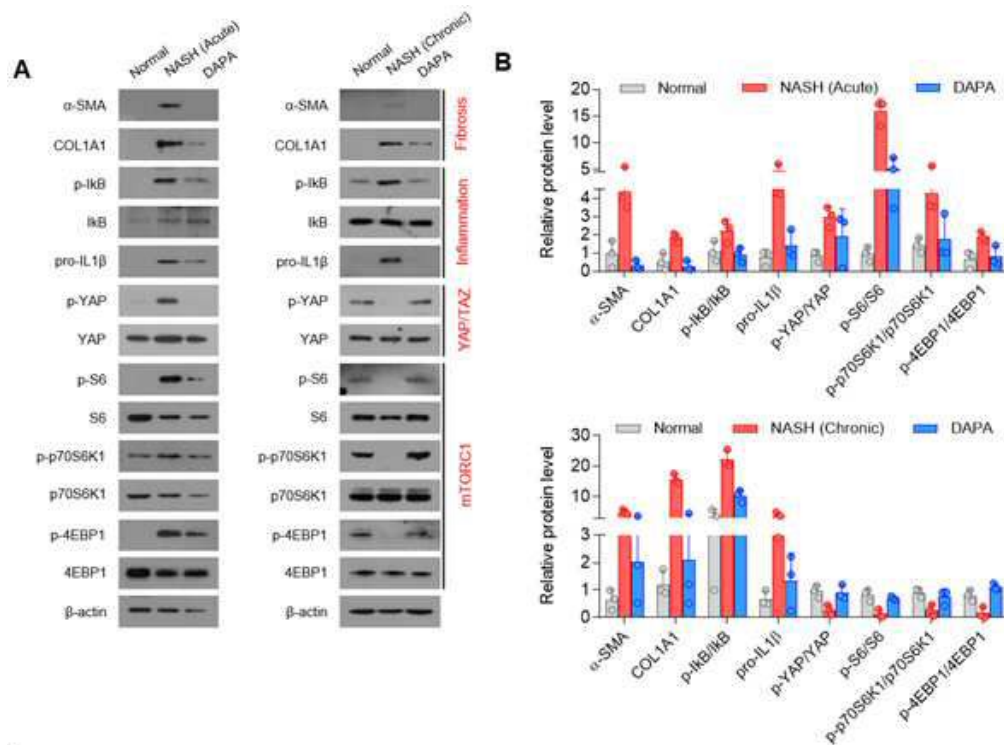
도면19



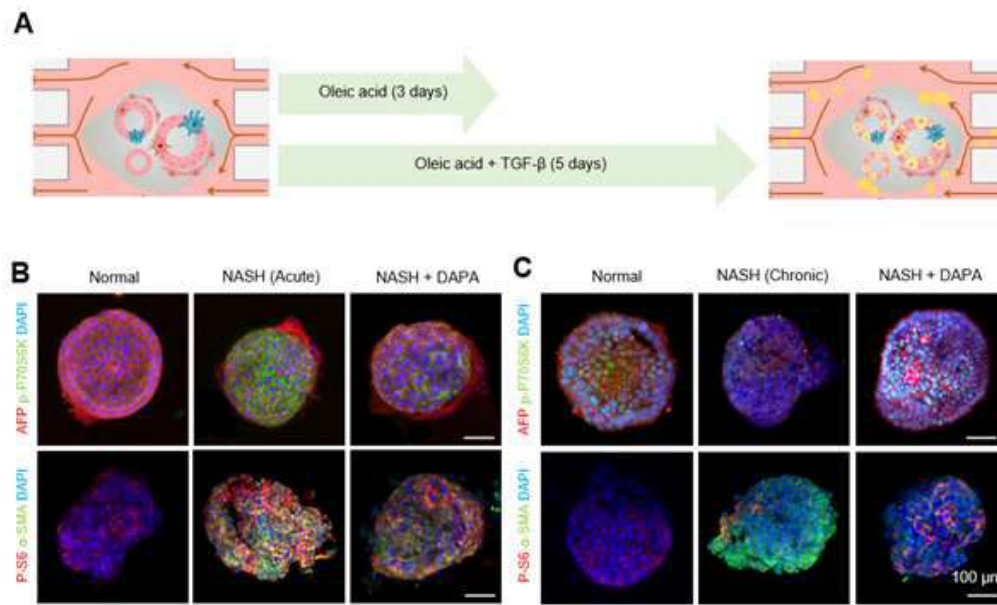
도면20



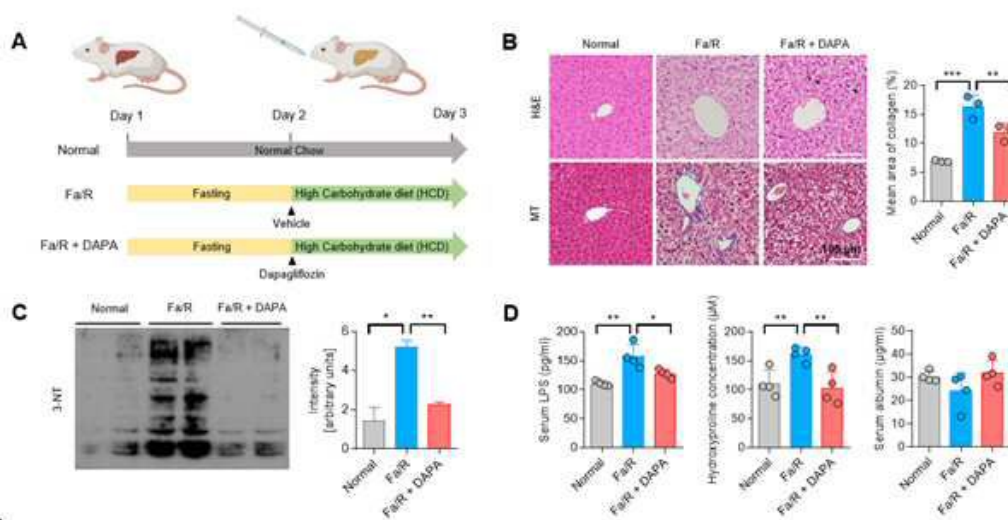
도면21



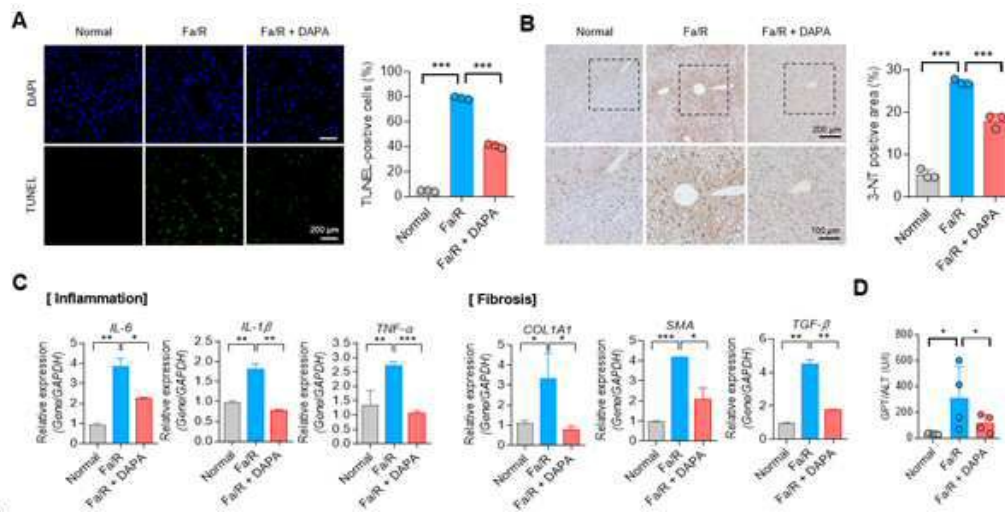
도면22



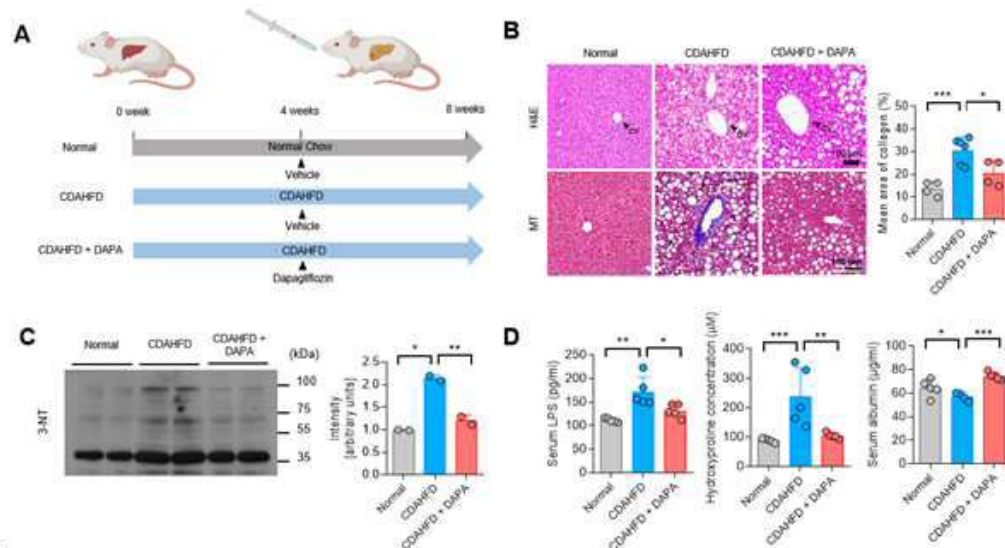
도면23



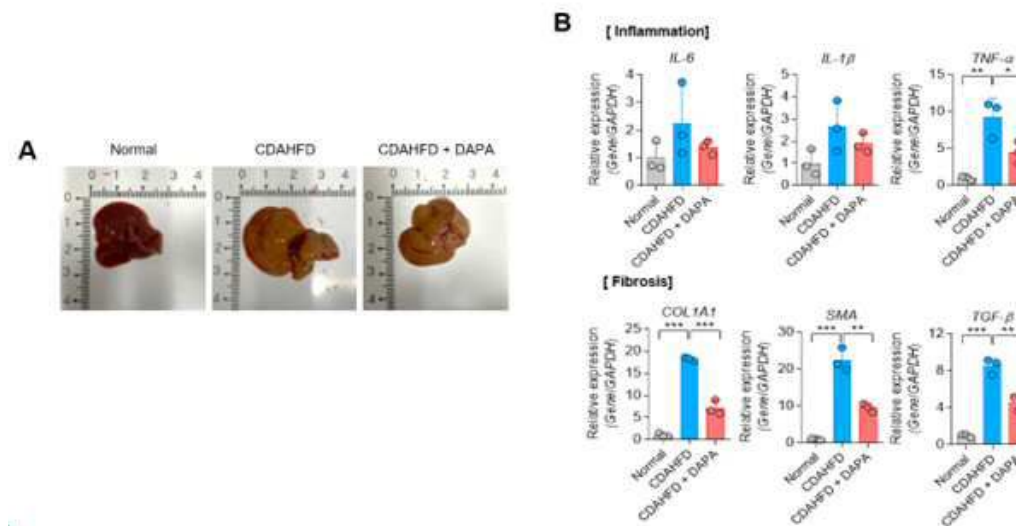
도면24



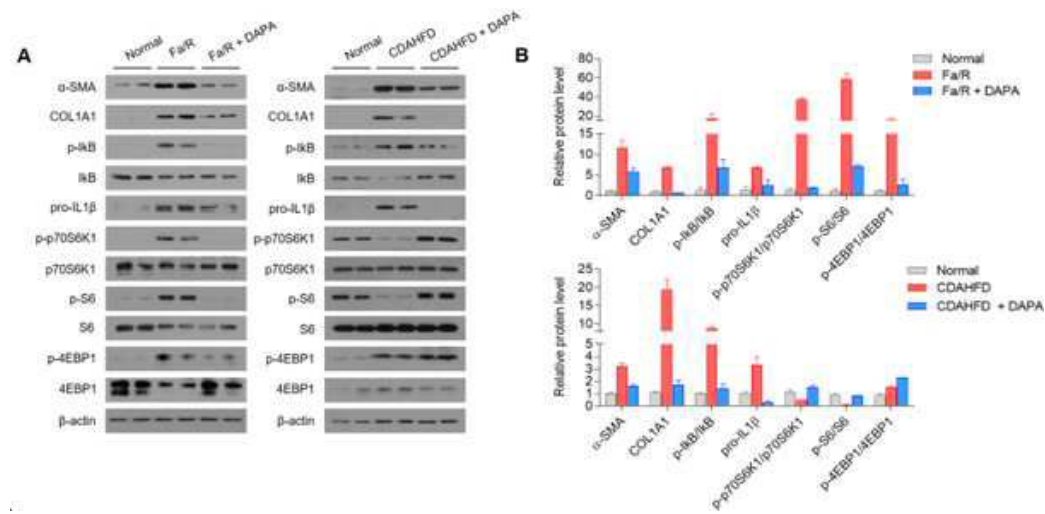
도면25



도면26



도면27



도면28

