

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0103980

(43) 공개일자 2021년08월24일

(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 10-2021-0019945

(22) 출원일자 2021년02월15일

심사청구일자 2021년02월15일

(30) 우선권주장

1020200018362 2020년02월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

조승우

서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호

민성진

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호

최이선

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 533호

(74) 대리인

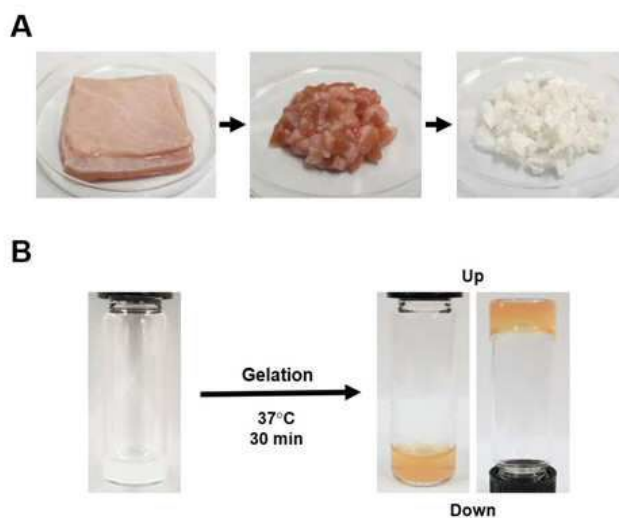
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 11 항

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

(57) 요약

본 발명은 탈세포 위 조직(Stomach Extracellular Matrix; SEM)을 이용한 위 오가노이드 배양 및 이식용 지지체에 관한 것이다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12N 5/0697 (2013.01)

C12N 2502/23 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083321
과제번호	2017R1A2B3005994
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	삼차원 세포 패터닝 미세자극 기반 심장 및 골격 근육세포 리프로그래밍 효율 증진
연구(3/3)	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711081384
과제번호	2018M3A9H1021382
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	간 조직 특이적 매트릭스와 마이크로 디바이스를 이용한 간오가노이드 생산 플랫폼
개발(2/3, 1단계)	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탈세포 위 조직 유래 세포외기질 (Stomach Extracellular Matrix; SEM)을 포함한 지지체 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 탈세포 위 조직 유래 세포외기질은 0.01 내지 10 mg/mL로 포함되는 것인 지지체 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 0.1 내지 10Hz 기준 탄성계수가 1 내지 100Pa인 지지체 조성물.

청구항 4

(a) 분리된 위 조직을 탈세포화하여 탈세포된 위 조직을 제조하는 단계;

(b) 상기 탈세포된 위 조직을 건조하여 탈세포 위 조직 유래 세포외기질(Stomach Extracellular Matrix; SEM)을 제조하는 단계; 및

(c) 상기 건조된 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계; 를 포함하는 지지체 조성물 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 분리된 위 조직은 탈세포 전에 세절하는 단계를 더 포함하는 지지체 조성물의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 위 조직을 탈세포화 용액에서 교반시키는 지지체 조성물 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 탈세포화 용액은 0.1 내지 5%의 Triton X-100 및 0.01 내지 0.5% 수산화 암모늄을 포함하는 것인 지지체 조성물 제조방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 (a) 단계의 탈세포는 위 조직 세포가 95 내지 99.9% 제거된 지지체 조성물 제조방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 (b) 단계 이후, 탈세포 위 조직 유래 세포외기질은 0.01 내지 10 mg/mL 로 포함되도록 조절하는 단계를 더 포함하는 것인 지지체 조성물 제조방법.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 지지체 조성물 제조방법은 관류 방식을 포함하지 않는 지지체 조성물 제조방법.

청구항 11

제1항의 지지체 조성물 또는 제4항의 제조방법에 의해 제조된 지지체 조성물에서 위 오가노이드를 배양하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[0003] 최근 각광받고 있는 오가노이드는 신약 스크리닝, 약물 독성 평가, 질환 모델링, 세포 치료제 등 다양한 응용 분야에 적용이 가능한 조직 유사체로서 전 세계적으로 급격하게 성장하고 있는 기술이다.

[0004] 뇌, 장, 간, 위 등 장기 별로 다양한 오가노이드 종류가 존재하는데 이를 연구하는 전 세계 수많은 연구팀에서 현재까지 오가노이드를 배양하기 위해 배양 지지체로서 매트리젤 (Matrigel) 제품을 이용하고 있다. 하지만 매트리젤은 쥐의 육종암 조직에서 추출한 세포외기질 성분이기 때문에, 제품의 품질을 균일하게 유지하기 어려우며 고가이고 동물성 감염균 및 바이러스 전이 등 안전성 측면에서 문제가 있어 오가노이드 배양 시스템으로서 매트리젤은 해결해야 하는 많은 문제점을 가지고 있다. 특히, 암 조직 유래의 소재로서 특정 조직 오가노이드 배양을 위해 필요한 최적의 조직 특이적 미세환경을 제공해 주지 못한다. 매트리젤을 대체하기 위한 고분자 기반 하이드로젤 개발 연구가 일부 진행되어 왔으나 아직까지 매트리젤을 대체할만한 수준의 소재는 보고된 바 없다.

[0005] 위 오가노이드는 위 조직에서 줄기세포를 추출하여 이를 삼차원 배양하는 방법을 통해 생산될 수 있다. 기본 보고된 매트리젤을 이용한 프로토콜로 배양된 위 오가노이드는 증식 능력을 유지하면서 장기간 배양할 수 있는 장점이 있지만, 위 조직을 구성하는 다양한 세포 중 벽세포(Parietal cell) 및 주세포(Chief cell)처럼 중요한 기능을 하는 세포로의 분화가 어렵다는 문제가 있다. 따라서 기존 매트리젤 기반 배양 시스템보다 구조 및 기능적으로 성숙하고 발달된 위 오가노이드를 제작할 수 있는 새로운 배양 소재 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 또한, 위궤양 및 위암 절제 이후 등 대량의 조직 손상이 발생하는 질병에는 약물 치료만으로는 한계가 있기 때문에 본질적으로 조직을 재생시킬 수 있는 세포 치료 및 조직공학 기술의 개발이 필요한 실정이다. 위 오가노이

드는 실제 위 조직에 존재하는 줄기세포를 포함한 다양한 세포들을 포함하고 있기 때문에, 오가노이드 기반 이식 및 치료가 각광을 받고 있다. 하지만 생체 내로 오가노이드의 효율적인 이식 및 생착을 증진시켜 줄 수 있는 이식용 소재의 개발도 필수적으로 요구되고 있다.

[0007] 본 발명은 돼지 위 조직으로부터 탈세포 과정을 거쳐 탈세포 위 조직 유래 세포외기질 성분 기반의 하이드로젤 지지체를 제작하고, 이를 위 오가노이드 배양에 적용하는 새로운 배양 플랫폼을 제안한다. 개발된 탈세포 조직 유래 지지체는 낮은 비용으로 쉽게 대량 제작이 가능하며 위 조직 특이적인 다양한 세포외기질 및 성장인자들이 포함되어 있어 위 오가노이드 특이적 삼차원 미세환경을 제공해 줄 수 있다. 개발된 지지체는 기존의 매트릭젤과 유사한 수준으로 위 오가노이드 형성 및 증식을 가능하게 하였으며 위 조직 특이적인 세포로의 분화 및 기능은 더욱 증진시킬 수 있음이 검증되었다. 나아가 탈세포 지지체는 손상된 위 조직 내로 위 오가노이드 이식 효율 및 생착을 향상시켜 오가노이드 이식용 소재로도 높은 활용 가능성을 보여준다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0143465호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 위 조직에 간단한 화학적 처리를 통해서, 대량의 탈세포 지지체를 제작할 수 있는 방법을 구축하였고 제작된 탈세포 위 조직 매트릭스를 위 오가노이드 배양에 이용하기 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 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.

[0018] 본 발명의 일 양상은 탈세포 위 조직 유래 세포외기질 (Stomach Extracellular Matrix; SEM)을 포함한 지지체 조성물을 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, 엘라스틴(elastins), 라미닌(laminins), 글리코사아미노글리칸(glycosaminoglycans), 프로테오글리칸, 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 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.
- [0022] 상기 “유래(derive)”, “유래된(derived)”은 유용한 방법에 의해 언급한 원천으로부터 수득한 성분을 의미한다.
- [0023] 또한, 본 발명의 일 구체예로, 상기 탈세포 위 조직 유래 세포외기질은 0.01 내지 10 mg/mL, 구체적으로 0.5 내지 8 mg/mL 더욱 구체적으로 1 mg/mL 내지 5 mg/mL, 가장 구체적으로는 1, 3, 5 또는 7 mg/mL, 최적화된 구체예로는 5 mg/mL로 포함하는 것일 수 있다. 상기 범위 외의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없거나, 제조 또는 활용에 있어서 부적합할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예로, 상기 조성물은 0.1 내지 10Hz 기준 탄성계수가 1 내지 100Pa일 수 있고, 상기 조성물이 상기 범위의 탄성계수를 가짐으로써 안정적인 고분자 네트워크를 형성할 수 있다.
- [0025] 상기 지지체 조성물은 탈세포화하여 수득한 위 조직 매트릭스 조성물을 기반으로 제조한 3차원 하이드로젤을 포함하며, 위 오가노이드 배양에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0026] 상기 탈세포화된 위 조직은 실제 조직 특이적 세포외기질 성분을 포함하므로 해당 조직의 물리적, 기계적, 생화학적 환경을 제공할 수 있으며, 위 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 (a) 분리된 위 조직을 탈세포화하여 탈세포된 위 조직을 제조하는 단계; (b) 상기 탈세포된 위 조직을 건조하여 탈세포 위 조직(Stomach Extracellular Matrix; SEM)을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 건조된 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계; 를 포함하는 지지체 조성물 제조방법을 제공한다.
- [0032] 상기 (a) 단계는 분리된 위 조직을 탈세포화하여 탈세포된 위 조직을 제조하는 단계이다.
- [0033] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 (a) 단계에서 분리된 위 조직은 탈세포 전에 세절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명은 탈세포 전에 위 조직을 세절하는 단계를 포함하여, 탈세포 공정이 더 효율적이고 완전한 세포 제거가 가능하다. 상기 분리된 위 조직의 세절 방법은 공지된 방법으로 이루어질 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 (a) 단계에서 상기 위 조직을 탈세포화 용액에서 교반시키는 것일 수 있다.
- [0035] 상기 탈세포화 용액은 위 조직에서 세포를 제거하기 위한 다양한 성분을 포함할 수 있고, 예컨대, 고장성 식염수(hypertonic saline), 과산화 아세트산(peracetic acid), 트리톤 X-100 (Triton X-100), SDS 또는 기타 세제 성분을 포함할 수 있으나, 본 발명의 일 구체예에서 상기 탈세포화 용액은 0.1 내지 5%의 Triton X-100 및 0.01 내지 0.5% 수산화 암모늄, 더욱 구체적으로는 1% Triton X-100 및 0.1% 수산화 암모늄(ammonium hydroxide)을 포함하는 것일 수 있다. 상기와 같은 탈세포화 용액을 사용함으로써, 기존의 공정에 비하여 완화된 조건에서 탈세포를 진행함으로써 제조된 지지체 내 DNA를 효과적으로 제거함과 동시에 위 조직 내의 다양한 단백질들이 더

많이 보존될 수 있다.

- [0036] 상기 교반은 24 내지 72시간, 더욱 구체적으로 36 내지 60시간, 가장 구체적으로는 40 내지 56시간, 일 예시로 48시간 동안 이루어지는 것일 수 있고, 이러한 교반(탈세포) 과정을 통해 위 조직 세포가 95 내지 99.9%, 더욱 구체적으로 96 내지 98%가 제거된 것일 수 있다. 상기 범위 외의 시간외로 탈세포가 이루어질 경우 제조된 지지체 조성물의 품질이 저하되거나 공정 경제성이 떨어지는 문제점이 있다.
- [0037] 상기 (b) 단계는 상기 탈세포된 위 조직을 건조하여 탈세포 위 조직(Stomach Extracellular Matrix; SEM)을 제조하는 단계이다.
- [0038] 상기 탈세포된 위 조직을 건조하는 방법은 공지의 방법으로 수행될 수 있으며, 자연건조 또는 동결 건조될 수 있고, 멸균을 위해 건조 후 전자 빔 또는 감마 방사선에 의해 에틸렌 옥사이드 가스 또는 초임계 이산화탄소에 노출시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 (b) 단계 이후, 탈세포 위 조직 유래 세포외기질은 0.01 내지 10 mg/mL, 구체적으로 0.5 내지 8 mg/mL 더욱 구체적으로 1 mg/mL 내지 5 mg/mL, 가장 구체적으로는 1, 3, 5 또는 7 mg/mL, 최적화된 구체예로는 5 mg/mL로 포함하도록 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 범위 외의 농도로 포함될 경우, 본 발명이 목적하는 효과를 얻을 수 없거나, 제조 또는 활용에 있어서 부적합할 수 있다.
- [0040] 상기 건조된 세포외기질은 박리(tearing), 제분(milling), 절단, 분쇄 및 전단 단계를 포함하는 방법에 의해 세분될 수 있다. 상기 세분된 세포외기질은 냉동 상태 또는 냉동 건조 상태에서, 분쇄 또는 제분과 같은 방법에 의해 분말 형상으로 가공될 수 있다.
- [0041] 상기 (c) 단계는 상기 건조된 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 겔화(gelation)하는 단계이다.
- [0042] 상기 겔화를 통해 탈세포 위 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.
- [0043] 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.
- [0044] 상기 겔화는 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 산성 용액에서 펩신 또는 트립신과 같은 단백질 분해 효소로 용액화하고, 10X PBS와 1 M NaOH를 이용하여 중성 pH와 1X PBS 버퍼의 전해질 상태로 맞추고 37°C의 온도에서 30 분 동안 이루어지는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예로 상기 지지체 조성물 제조방법은 관류 방식을 포함하지 않을 수 있다. 관류 방식(perfusion)을 적용하지 않아 탈세포 용액의 낭비를 줄일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 다른 일 양상은 상기 지지체 조성물 또는 상기 제조방법에 의해 제조된 지지체 조성물에서 위 오가노이드를 배양하는 방법을 제공한다.
- [0048] 기존의 매트릭젤 기반 배양 시스템은 동물 암조직 유래의 추출물로서 배치 간의 차이가 크고 실제 위의 환경을 모사해주지 못하고, 위 오가노이드로 분화, 발달되는 효율이 미흡한 반면, 상기 지지체 조성물은 위 조직 유사 환경을 조성할 수 있으므로 위 오가노이드 배양에 있어서 적합하다.
- [0049] 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.
- [0050] 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

- [0052] 본 발명에서 개발된 탈세포 위 조직 유래 인공 지지체는 기존의 대표적인 오가노이드 배양용 지지체인 매트릭젤

이 가지고 있는 한계를 극복한 새로운 위 오가노이드 배양 지지체로서 개발되어, 위 오가노이드 기반의 대규모 실험 스크리닝 플랫폼이나 조직 재생을 위한 세포 치료제 등 다양한 전임상, 임상 연구의 요소 기술로 활용되어 산업적, 경제적 측면에서 고부가가치를 창출하고 의료 신산업의 발전을 도모할 수 있을 것으로 기대된다.

[0053] 탈세포 위 조직 유래 인공 매트릭스 지지체는 다양한 난치성 위 질환 (위궤양, 위암 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 위질환은 최근 유병률이 크게 증가하여 많은 연구가 필요한 상황이므로 연구용 시약으로서도 수익 창출이 가능하다. 또한, 위 조직 특이적 세포외기질 미세환경 내에서 위 오가노이드와 감염균 (예; 헬리코박터 파이로리)과의 공배양과 연계하여 최근 크게 각광받고 있으나 실질적인 연구가 어려웠던 기초 연구에도 활용될 수 있으므로 무궁한 응용 가능성을 가질 것으로 기대한다.

[0054] 본 발명에서 개발된 인공 지지체는 조직 줄기세포 유래 위 오가노이드 뿐 아니라 위암 유래 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.

[0055] 종합적으로 위에서 기술했듯이 위 오가노이드의 응용을 위해서는 기본적으로 매트릭스라는 배양용 지지체가 필수적으로 요구된다. 매트릭스와 비교하여 본 발명에서 개발된 인공 지지체는 배양 시스템으로서 매트릭스 이상의 기능성을 보여주며 보다 안전하고 비용적인 측면에서도 매우 유리한 장점을 가지고 있음이 검증된다. 따라서 이러한 매트릭스 대체 효과만으로도 막대한 경제적 수익 창출이 예측된다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 위 오가노이드 배양을 위한 탈세포 위 조직 유래 지지체 (Stomach Extracellular Matrix; SEM) 제작을 나타낸 것이다.

도 2는 제작한 탈세포 위 조직 유래 지지체(SEM)의 특성을 분석한 것이다.

도 3은 탈세포 위 조직 유래 지지체(SEM)의 농도에 따른 물성을 분석한 것이다.

도 4 및 5는 위 조직의 탈세포 방법을 비교 분석한 결과이다.

도 6은 위 조직의 탈세포 방법에 따른 위 오가노이드 배양 양상의 비교한 결과이다.

도 7은 탈세포 위 조직 유래 지지체(SEM)의 단백질을 분석한 것이다.

도 8 및 9는 탈세포 위 조직 유래 지지체(SEM)의 matrisome 단백질 종류 및 정량 분석한 결과이다.

도 10은 탈세포 위 조직 유래 지지체(SEM)의 non-matrisome 단백질을 분석한 결과이다.

도 11은 위 오가노이드 배양에 최적의 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체의 농도를 선정한 것이다.

도 12는 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체의 농도에 따른 위 오가노이드 배양 양상을 비교한 것이다.

도 13은 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체와 기존의 배양 지지체(매트릭스)에서 형성된 위 오가노이드 성장을 비교한 것이다.

도 14는 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체와 기존의 배양 지지체(매트릭스)에서 형성된 위 오가노이드를 비교한 것이다.

도 15는 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체와 매트릭스에서 배양된 위 오가노이드 산 분비 기능을 비교 분석한 것이다.

도 16은 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체와 매트릭스의 혼합을 통한 위 오가노이드 분화 증진 효과를 나타낸 것이다.

도 17은 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체와 매트릭스의 혼합을 통한 위 오가노이드 기능 증진 효과를 나타낸 것이다.

도 18은 위 오가노이드 배양을 위한 탈세포 위 조직 유래 지지체의 조직 특이적 효과를 확인한 것이다.

도 19는 피부 조직과 위 조직 사이의 세포외기질 성분 차이를 확인한 결과이다.

도 20은 탈세포 위 조직 유래 지지체의 조직 연령에 따른 세포외기질 성분 차이를 분석한 결과이다.

도 21은 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 위 오가노이드 장기 배양을 위한 배양액 조건 최적화를 나타낸 것이다.

도 22는 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체를 이용한 위 오가노이드 장기 배양을 나타낸 것이다.

도 23 및 24는 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체를 이용해서 배양한 위 오가노이드의 전사체(transcriptome) 발현을 분석한 것이다.

도 25은 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체를 이용한 위 오가노이드 생체 내 이식을 나타낸 것이다.

도 26 및 27은 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤의 장기 보관 가능성을 검증한 것이다.

도 28는 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체를 이용한 위암 오가노이드 배양을 나타낸 것이다.

도 29는 미세유체 디바이스와 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤을 이용한 위 오가노이드의 대량 배양 가능성 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 본 발명에서는 위 조직에 간단한 화학적 처리를 통해서, 대량의 탈세포 지지체를 제작할 수 있는 방법을 구축하였고 제작된 탈세포 위 조직 매트릭스를 위 오가노이드 배양에 이용한다.
- [0059] 본 발명에서 개발된 탈세포 지지체가 세포 성분은 모두 제거되고, 위 조직에 함유된 다양한 세포외기질 및 성장인자들을 함유하고 있는 것을 확인하여, 위 오가노이드 배양을 위한 최적의 삼차원 미세환경을 제공해 줄 수 있음을 확인하였다.
- [0060] 개발된 탈세포 위 조직 유래의 하이드로젤 지지체 내에서 위 오가노이드가 발생하고 성장함을 확인하였고, 위 오가노이드 배양에 효율적으로 이용하기 위해 탈세포 지지체를 다양한 농도로 시험하여 위 오가노이드 배양에 최적화된 농도를 선별하였다.
- [0061] 개발된 탈세포 지지체와 대조군인 매트릭셀에서 비슷한 양상으로 위 오가노이드를 배양할 수 있고 다양한 위 조직 세포로의 분화도 이루어지는 것을 확인하였다. 이를 통해서, 탈세포 지지체를 매트릭셀의 대체체로서 이용할 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한, 필요시 매트릭셀과의 적절한 배합을 통해 오가노이드 분화를 더욱 증진시킬 수 있는 조건을 찾아내었다. 이는 본 발명에서 개발된 지지체에서 배양된 위 오가노이드가 기존의 오가노이드 보다 더욱 실제 위 조직 구조 및 기능을 잘 모사할 수 있는 가능성을 보여준다.
- [0062] 본 발명에서 개발된 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체에 의한 오가노이드 분화 증진 효과뿐만 아니라 산분비 기능 증진 효과도 확인하였다. 이를 통해 기존의 매트릭셀에서 배양된 위 오가노이드의 한계를 넘어 분화와 기능이 모두 증진된 위 오가노이드를 생산할 수 있는 배양 기술을 구축하였다. 장기 배양 동안에도 오가노이드의 줄기세포능(stemness)이 매트릭셀 조건과 비교하여 비슷한 수준으로 유지되는 것을 확인하였다.
- [0063] 본 발명에서 개발한 탈세포 지지체의 조직 특이적인 효과를 확인하기 위해, 위, 장, 피부, 림프, 심장, 근육 유래의 탈세포 지지체에서 각각 위 오가노이드를 배양하고 비교하였다. 피부, 림프, 심장, 근육 같은 다른 조직 유래 탈세포 지지체에 비해 탈세포 위 조직 유래 지지체에서 배양된 위 오가노이드의 형성 효율 및 줄기세포 관련 유전자 발현이 가장 우수한 것을 관찰하여 개발된 지지체가 조직 특이적 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.
- [0064] 본 발명에서 생쥐에서 위궤양 모델을 제작하여 탈세포 지지체를 이용하여 위 오가노이드를 이식하였을 때 위 조직에 생착이 되어 이식이 가능함을 확인하였고, 따라서 탈세포 지지체의 이식용 소재로서의 높은 활용 가능성도 확인하였다.
- [0065] 본 발명에서 탈세포 지지체를 냉장 및 냉동 상태에서 장기간 보관한 뒤, 위 오가노이드 배양에 이용했을 때 새롭게 제작한 지지체와 비교하여 유사한 수준으로 위 오가노이드 형성이 가능하다는 것을 검증하였다. 이는 개발된 지지체의 장기 보관 가능성 및 안정성을 보여주는 결과로서 추후 탈세포 지지체의 상용화 및 산업화 가능성이 높음을 시사한다.
- [0066] 본 발명에서 탈세포 지지체를 이용해 줄기세포 유래 오가노이드 뿐 아니라 위암 오가노이드도 성공적으로 배양 가능함을 확인하였다. 따라서 추후 개인 맞춤형 체외 암 모델로서 적용하여 항암 약물 스크리닝 및 신약 개발에

도 적용 가능한 고도화된 배양 요소 기술로서도 높은 활용도를 가진다.

- [0068] 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.
- [0070] **실시예 1: 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 제조**
- [0071] 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물을 다음과 같이 제조하였다 (도 1 (A) 참고).
- [0072] **실시예 1-1. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질 (Stomach Extracellular Matrix; SEM)의 제조**
- [0073] 돼지 위 조직 분리하고 세절하여 준비하였고, 상기 위 조직을 1% Triton X-100 및 0.1% 수산화 암모늄(ammonium hydroxide)과 함께 교반하여 위 조직의 세포만을 제거하여 탈세포 위 조직을 제조하였다.
- [0074] 이후, 탈세포 위 조직을 동결건조, 분쇄하여 탈세포 위 조직 유래 세포외기질 (Stomach Extracellular Matrix; SEM)을 제조하였다.
- [0075] **실시예 1-2. 지지체 조성물의 제조**
- [0076] 상기 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 10 mg을 4 mg/ml 펩신 용액 (돼지 위 점막 유래 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 (도 1 (B)).
- [0078] **실험예 1: 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 분석**
- [0079] 실시예 1-1.의 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 아래와 같이 분석하였다.
- [0080] **실험예 1-1. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 특성 분석**
- [0081] 실시예 1-1.의 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 특성을 분석하였다.
- [0082] 제작한 탈세포 위 조직 유래 세포외기질 (SEM) 지지체에서 세포가 충분히 제거되었는지 확인하기 위해 탈세포 과정 전후의 DNA양을 비교하고, 세포외기질(Extracellular matrix) 성분들은 남아있는지 확인하기 위해 대표적인 세포외기질 성분인 Glycosaminoglycans(GAG)양을 정량 비교한 결과, 탈세포 과정 후 세포는 모두 제거되고, GAG는 실제 위 조직에서와 유사한 수준으로 유지되고 있는 것을 확인하였다 (도 2 (A)).
- [0083] 또한, 마찬가지로 탈세포 과정 후에 세포는 모두 제거되고 위 조직의 매트릭스 구조는 잘 유지되었는지 확인하기 위해 H&E 조직 염색을 통해 분석한 결과, 세포핵이 관찰되지 않았기에 세포가 대부분 제거된 것을 확인할 수 있었다 (도 2 (B)).
- [0084] 한편, 전체적인 위 조직의 매트릭스 구조는 그대로 남아있는 것을 확인하기 위해 제작한 탈세포 위 조직 유래 지지체의 하이드로젤 형성 후 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM) 분석을 통해 하이드로젤 내부의 구조를 확인하였다. 그 결과, SEM 하이드로젤이 콜라겐 하이드로젤과 유사한 형태의 나노섬유 구조를 가지는 것을 관찰하여 위 오가노이드의 부착 및 성장에 적합한 내부 구조를 가지고 있음을 확인하였다 (도 2 (C)).
- [0086] **실험예 1-2. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 농도별 특성 분석**
- [0087] 실시예 1-1.의 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 농도별 특성을 분석하였다.
- [0088] 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 농도별로 지지체 조성물을 이용하여 하이드로젤을 형성한 뒤 4가지 SEM 농도에 따른 물성 변화를 유변학 분석을 통해 측정하였다.
- [0089] 그 결과, 도 3에서 확인되는 바와 같이, 모든 농도 조건에서 storage modulus (G') 값이 loss modulus (G'') 값 보다 일관되게 높음을 확인함으로써 하이드로젤 내 가교를 통해 안정적인 고분자 네트워크가 형성됨을 확인하였다. SEM 농도가 증가할수록 기계적 물성(modulus)도 커지는 것을 확인하였다.

[0091] 실험예 1-3. 탈세포 조건별 비교 분석

[0092] 본 연구에서 확립한 탈세포 방법 (Protocol 1)과 기존 문헌에 보고된 바가 있는 탈세포 방법 (Protocol 2)을 비교하기 위한 실험을 수행하였다.

[0093] 기존 문헌은 4% sodium deoxycholate (SDC)을 4시간 처리한 후 Dnase I을 이용하여 DNA를 제거하였고, 본 연구에서는 조직 내 단백질의 손상을 최소화하기 위해 더 완화된 조건인 비이온성 1% Triton X-100과 0.1 % ammonium hydroxide를 혼합한 용액만을 사용하였다.

[0094] 그 결과, 탈세포 공정 후 남은 DNA의 양을 비교해 보았을 때 두 가지 프로토콜 모두 DNA가 성공적을 제거된 것을 확인하였으나, GAG 정량을 통해 남아있는 세포외기질 성분을 비교해보면 프로토콜 1로 처리된 조직에서는 GAG 성분이 잘 보존되어 있는 반면 프로토콜 2로 처리된 조직에는 남아있는 GAG 성분이 유의미하게 줄어든 것을 확인할 수 있다 (도 4 (a)).

[0095] 또한, 제작한 탈세포 매트릭스를 이용하여 하이드로젤을 제작한 후 기계적 물성 (modulus)을 측정하였다. 프로토콜 1로 제작한 하이드로젤의 물성이 유의미하게 높은 것을 확인하였다 (도 4(b)).

[0096] H&E 조직학 분석으로 비교해본 결과, 두 방법 모두 세포는 잘 제거되었으나 프로토콜 1에서 세포외기질 성분들이 더욱 잘 보존되어 있는 것을 확인하였다 (도 4 (c)).

[0097] 탈세포 방법으로 제작된 매트릭스의 단백질 (proteomics) 분석을 실시하였다. 프로토콜 1이 프로토콜 2에 비해 더 많은 개수의 위 조직 특이적 세포외기질 단백질을 보존하는데 효과적임을 확인하였다 (도 4 (d)).

[0098] 이를 통해 본 연구에서 확립한 탈세포 프로토콜이 기존의 방법보다 위 조직의 세포외기질 성분을 더욱 잘 보존할 수 있으며, 따라서 위 오가노이드 배양에 더욱 유리하게 작용할 수 있을 것으로 예측할 수 있다.

[0100] 한편, 본 연구에서 확립한 탈세포 방법 (Protocol 1)과 기존에 많이 쓰이는 탈세포 방법 (Protocol 3)을 비교하기 위한 실험을 수행하였다.

[0101] 구체적으로, 프로토콜 3는 본 연구에서 확립한 탈세포 프로토콜 1에 탈세포 시약으로 많이 쓰이는 3% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 추가로 24시간 처리한 프로토콜이다.

[0102] 그 결과, 탈세포 공정 후 남은 DNA의 양을 비교해 보았을 때 두 가지 프로토콜 모두 DNA가 성공적을 제거된 것을 확인하였으나, GAG 정량을 통해 남아있는 세포외기질 성분을 비교해보면 프로토콜 3으로 처리된 조직에서는 남아있는 GAG 성분이 유의미하게 감소된 것을 확인할 수 있다 (도 5(a))

[0103] 또한, 제작한 탈세포 매트릭스를 이용하여 하이드로젤을 제작한 후 기계적 물성 (modulus)을 측정하였고, 각 프로토콜로 제작한 하이드로젤의 물성은 큰 차이가 없는 것을 확인하였다 (도 5 (b)).

[0104] H&E 조직학 분석으로 비교해본 결과, 두 방법 모두 세포는 잘 제거되었으나 프로토콜 1에서 세포외기질 성분들이 더욱 잘 보존되어있는 것을 확인하였다 (도 5 (c))

[0105] 각 탈세포 방법으로 제작된 매트릭스의 단백질 (proteomics) 분석을 실시하였고, 그 결과 프로토콜 1이 프로토콜 3에 비해 더 많은 개수의 위 조직 특이적 세포외기질 단백질을 보존하는데 효과적임을 확인하였다 (도 5(d))

[0106] 이를 통해 본 연구에서 확립한 탈세포 프로토콜이 SDS 시약을 사용하는 방법보다 위 조직의 세포외기질 성분을 더 잘 보존할 수 있으며, 따라서 위 오가노이드 배양에 더욱 유리하게 작용할 수 있을 것을 예측할 수 있다.

[0108] 실험예 1-4. 탈세포 조건별 위 오가노이드 배양 양상 차이 확인

[0109] 위 오가노이드 배양 매트릭스 제작을 위한 탈세포 공정에 있어 본 연구에서 확립한 탈세포 방법 (Protocol 1)과 기존에 많이 쓰이는 탈세포 방법 (Protocol 3)을 비교하기 위한 실험을 진행하였다.

[0110] 구체적으로, 각 프로토콜로 제작된 탈세포 매트릭스 하이드로젤에 위 오가노이드를 배양하여 형성 효율 및 유전자 발현을 분석하였다.

[0111] 그 결과, 배양 5일차의 오가노이드 형태 분석을 통해, 프로토콜 1로 제작한 탈세포 매트릭스에서 배양된 위 오

가노이드가 프로토콜 3으로 제작한 오가노이드 보다 더욱 크기가 크고 구형 구조를 잘 유지하고 있는 것을 확인하였다. 또한, 형성효율을 정량해본 결과, 프로토콜 1이 유의미하게 높은 것을 확인하였다 (도 6 (a)).

[0112] 배양 5일차에 정량적 qPCR 실험을 통해 줄기세포능 (stemness)에 중요한 Lgr5 유전자 발현을 비교해 보았을 때, 프로토콜 1로 제작된 탈세포 위 조직 유래 매트릭스에서 형성된 위 오가노이드가 유의미하게 높은 발현을 보이는 것을 확인하였다 (도 6 (b)).

[0113] 이를 통해 본 연구에서 확립한 탈세포 프로토콜이 기존의 방법보다 위 오가노이드 배양에 더욱 적합한 것을 검증하였다.

[0115] 실험예 1-5. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질(SEM)의 단백질 분석

[0116] 제작한 탈세포 위 조직 유래 지지체(SEM)은 실제 위 조직 내에 존재하는 다양한 위 조직 특이적 단백질들을 포함하고 있다. 따라서 세부적인 구성 성분들을 파악하기 위해 SEM 지지체에 대한 proteomics 분석을 실시하여 다양한 세포외기질 관련 단백질들(glycoproteins, proteoglycans, collagens, secreted factor 등)이 탈세포 매트릭스에 포함되어 있는 것을 확인하였다.

[0117] 그 결과, 도 7에서 확인된 바와 같이, 제작한 탈세포 위 조직 유래 지지체(SEM)은 실제 위 조직 내에 존재하는 다양한 위 조직 특이적 단백질들을 포함하고 있었다. 4개의 다른 조직 배치 유래의 SEM 샘플을 분석하였을 때 이러한 세포외기질 성분들은 공통적으로 거의 유사하게 관찰이 되었다. 따라서 탈세포 공정을 거친 SEM 하이드로젤 지지체를 이용한 배양을 통해 균일한 수준의 위 오가노이드 생산이 가능할 것을 유추할 수 있다.

[0119] 실험예 1-6. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 단백질 종류 및 정량 분석

[0120] 본 발명의 세포외기질의 단백질 종류 및 정량 분석하였다.

[0121] 구체적으로, 탈세포 위 조직을 lysis buffer [4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6), and 1X protease inhibitor]를 이용하여 용액화 한 뒤, 단백질 성분들을 추출하여 펩타이드 수준으로 분해하였다. 그 후 질량 분석기 (mass spectrometer)와 MaxQuant 소프트웨어를 이용하여, 펩타이드의 종류와 상대적인 값을 검출하였다. 이후 기존 라이브러리를 이용하여 matrisome 등 상세 분류를 진행하였다.

[0122] 그 결과, 매트릭셀 및 SEM에 포함된 matrisome 단백질들을 단백질 분석을 통해 검출하여 종류별로 분류함. SEM에서 검출된 matrisome 단백질의 개수가 매트릭셀 보다 많은 것을 확인할 수 있다 (도 8 (a)).

[0123] 또한, 매트릭셀 및 SEM을 구성하고 있는 matrisome 단백질들의 상대적인 정량 분석을 진행하여 이를 수치로 나타낸 결과, 매트릭셀은 96% 이상의 glycoproteins으로 구성되어 있음을 확인할 수 있고, SEM은 collagens 40%, proteoglycans 35%, glycoproteins 15% 정도로 각 matrisome 단백질들이 고르게 분포하고 있는 것을 확인하였다 (도 8 (b)).

[0124] 따라서 SEM 지지체가 기존 매트릭셀과 비교하여 훨씬 다양한 종류의 세포외기질 성분들을 포함하고 있기 때문에 위 오가노이드 배양에 보다 적합한 미세환경을 제공해 줄 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

[0126] 상기 matrisome 단백질 데이터에 대해서 상대 정량 분석을 실시한 결과, 매트릭셀의 경우 95% 이상 대부분의 단백질이 glycoproteins으로 이루어진 것을 확인할 수 있고, 가장 많이 포함되어 있는 10가지 matrisome 단백질들을 확인해 보았을 때에도 대표적인 glycoprotein인 laminin이 굉장히 높은 비율을 차지하고 있는 것을 확인하였다. 그리고 실제 위 조직에 특이적으로 많이 발현된다고 알려진 단백질들은 한 개도 검출되지 않았다 (도 9 (a)).

[0127] 마찬가지로 SEM에 포함되어 있는 matrisome 단백질들의 상대 정량 분석을 실시하였을 때, SEM에는 collagens, proteoglycans, glycoproteins 순으로 matrisome 단백질들이 많이 함유되어 있고 골고루 분포하고 있는 것을 확인하였다. 또한, 가장 많이 포함되어 있는 10가지 matrisome 단백질을 살펴보았을 때, 매트릭셀과 달리 콜라겐이 굉장히 많이 존재하는 것을 확인하였다. 그리고 SEM에서 실제 위 조직에 특이적으로 많이 발현된다고 알려진 non-matrisome 단백질들이 5종류가 검출되었다. 이러한 위 조직 특이적 성분들도 위 오가노이드 성장 및 발달에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다 (도 9 (b)).

- [0128] 따라서, 이러한 단백질 구성을 가진 SEM 지지체가 기존의 매트릭젤 보다 위 오가노이드 배양에 더욱 적합한 하이드로젤로 적용될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.
- [0130] **실험예 1-7. 탈세포 위 조직 내의 non-matrisome 단백질 분석**
- [0131] 본 발명의 탈세포 위 조직 내에 포함된 non-matrisome 단백질을 매트릭젤과 비교 분석하였다.
- [0132] 구체적으로, 탈세포 위 조직을 lysis buffer [4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6), and 1X protease inhibitor]를 이용하여 용액화 한 뒤, 단백질 성분들을 추출하여 펩타이드 수준으로 분해하였다. 그 후 질량 분석기 (mass spectrometer)와 MaxQuant 소프트웨어를 이용하여, 펩타이드의 종류와 상대적인 값을 검출하였다. 이후 기존 라이브러리를 이용하여 matrisome 등 상세 분류를 진행하였다.
- [0133] 그 결과, 도 10에서 확인된 바와 같이, 매트릭젤은 대부분의 구성 단백질이 matrisome 단백질인 것을 확인하였고, 이 중 matrisome 단백질이 아닌 non-matrisome 단백질들을 GOBP (gene ontology biological process) 방법으로 분석하여, 어떠한 biological process와 관련된 단백질들이 많이 포함되어 있는지 분석하여 비교하였다. 매트릭젤은 번역 (translation) 또는 대사 관련 단백질들을 많이 함유하고 있는 것으로 확인되었다 (도 10 (a)).
- [0134] SEM에는 non-matrisome 단백질들을 비교적 더 많이 함유하고 있음을 확인하였다. 이러한 단백질들의 역할을 GOBP 방법으로 분석해본 결과, 세포 기관 조직 (organelle organization), 세포 골격 조직 (cytoskeleton organization) 등 세포와 조직의 형성에 관련된 단백질들을 특히 많이 함유하고 있는 것을 확인하였다 (도 10 (b)).
- [0135] 따라서, 이러한 non-matrisome 단백질들을 포함하고 있는 SEM 지지체가 기존의 매트릭젤 보다 위 오가노이드 배양에 더욱 적합한 하이드로젤로 적용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [0137] **실험예 2: 탈세포 위 조직 유래 세포외기질을 포함한 지지체 조성물의 분석**
- [0138] **실험예 2-1. 지지체 조성물 내 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 최적 농도 선정**
- [0139] 실시예 1-2.에서 제조된 지지체 조성물 (하이드로젤)과 관련하여 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 최적농도를 선정하였다.
- [0140] 구체적으로, 탈세포 위 조직 유래 지지체를 오가노이드 배양에 적용할 때 가장 최적의 하이드로젤 농도를 선정하기 위해 SEM 농도 별 (1, 3, 5, 및 7 mg/mL)로 하이드로젤을 제작하고 위 오가노이드를 배양하였다. 생쥐의 위 조직으로부터 가장 기능적인 단위체인 위샘 (stomach gland) 조직을 추출하고 이를 각 하이드로젤 내에서 삼차원 배양하여 위 오가노이드를 형성을 유도하였다. 배양 5일차에 각 SEM 농도 조건에서 형성된 위 오가노이드의 형태와 형성 효율을 매트릭젤에서 형성된 위 오가노이드와 비교하였다.
- [0141] 그 결과, 도 11에서 확인되는 바와 같이, 모든 농도 조건의 SEM 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드가 대조군으로 이용한 매트릭젤에서 배양된 오가노이드와 비슷하게 구형으로 형성되는 것을 확인하였다. 그리고, 1 mg/ml 농도의 경우는 크기가 비교적 작은 오가노이드가 형성되었다 (도 11 (A)). 각 SEM 농도 별로 위 오가노이드 형성 효율을 비교해 보았을 때, SEM 하이드로젤을 이용한 배양의 경우 대부분의 농도에서 매트릭젤에 비해서 형성 효율이 낮지만 5 mg/ml 농도의 SEM 하이드로젤에서 다른 농도에 비해서 가장 높은 형성 효율을 보여줌을 확인하였다 (도 11 (B)).
- [0143] **실험예 2-2. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 농도별 지지체 조성물에서 배양된 위 오가노이드 배양 양상 비교**
- [0144] 실시예 1-2.에서 제조된 지지체 조성물 (하이드로젤)과 관련하여 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 농도별 위 오가노이드 배양 양상을 비교하였다.
- [0145] 구체적으로, 탈세포 위 조직 유래 지지체를 위 오가노이드 배양에 적용 시 최적의 SEM 하이드로젤 농도를 선별하기 위해 SEM 농도별(1, 3, 5, 및 7 mg/mL)로 제작된 하이드로젤에서 위 오가노이드를 배양하였다. 매트릭젤은

대조군으로 이용하였다.

- [0146] 그 결과, 각 농도 별로 제작된 SEM 하이드로젤에서 5일간 배양된 위 오가노이드의 mRNA 발현양을 정량적 PCR (q-PCR) 분석을 통해 비교해 보았을 때, 줄기세포능(stemness)과 관련된 유전자인 Lgr5는 1 mg/ml 농도와 7 mg/ml 농도에서 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 위 조직의 특정 세포 종류에서 발현하는 유전자인 Pgc (chief cell)와 Atp4a, Atp4b (parietal cell)는 농도가 높아질수록 발현이 증가하는 경향을 보인다. 전반적으로 5 mg/ml SEM 농도가 대조군인 매트리젤 그룹에 비해 줄기세포능(stemness - Lgr5 발현)은 유지되면서 다양한 위 조직 특이적 세포 종류로의 분화를 촉진하기 적합한 농도인 것으로 판단된다 (도 12 (A)).
- [0147] 또한, 같은 5일차에 면역염색을 통해 위 조직 세포 마커인 Muc5ac(gastric pit cell)와 HK(parietal cell)의 발현양을 비교한 결과, 전체적으로 위 조직 특이적 마커 단백질 발현양이 SEM 하이드로젤 농도가 높아질수록 증가함을 확인하였다 (도 12 (B)). SEM 하이드로젤 농도 스크리닝을 통해서 추후 실험은 위 오가노이드의 증식과 분화 효과를 모두 기대할 수 있는 SEM 5 mg/ml 조건으로 확정하여 진행하였다.
- [0149] **실험예 2-3. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물과 기존 배양 지지체에서 배양된 위 오가노이드 배양 양상 비교**
- [0150] 본 발명의 지지체 조성물과 기존 배양 지지체 (매트리젤)에서 배양된 위 오가노이드 배양 양상을 비교하였다.
- [0151] 구체적으로, 오가노이드 배양에 가장 널리 이용되는 매트리젤과 탈세포 위 조직 유래 SEM 하이드로젤 (5 mg/ml) 지지체에서 자라는 위 오가노이드의 비교하였다.
- [0152] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 각 지지체에서 형성된 위 오가노이드가 모두 계속 크기가 커지면서 계대 배양 직전 5~6일까지 배양이 잘 되는 것을 확인하였다.
- [0154] **실험예 2-4. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물과 기존 배양 지지체에서 배양된 위 오가노이드 비교**
- [0155] 오가노이드 배양에 가장 널리 이용되는 매트리젤과 탈세포 위 조직 유래 SEM 하이드로젤 (5 mg/ml) 지지체에서 배양된 위 오가노이드의 다양한 비교 분석하였다.
- [0156] 구체적으로, 배양 5일차에 각 배양 지지체에서 배양된 위 오가노이드의 유전자 발현과 단백질 발현을 비교하였다.
- [0157] 탈세포 SEM 하이드로젤 지지체와 매트리젤에서 배양된 위 오가노이드의 마커 발현을 mRNA 수준에서 비교해 보았을 때, 줄기세포 마커인 Lgr5와 Axin2 발현은 비슷한 수준을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 위의 다양한 세포 종류에서 발현되는 유전자인 Muc6 (neck cell), Gif (parietal cell), Pgc, Pga5 (chief cell)을 비교해 보았을 때에도 비슷한 수준을 보이는 것을 확인하였다 (도 14 (A)).
- [0158] 또한, 면역염색을 통해서 단백질 발현을 비교해 보았을 때 두 그룹의 오가노이드 모두 줄기세포 마커 및 증식과 관련된 LGR5, SOX9, KI67 및 분화 관련 마커 MUC5AC (gastric pit cell), CHGA (endocrine cell), HK (parietal cell)들이 모두 비슷한 수준으로 잘 발현되는 것을 확인하였다. 각 오가노이드에서 세포 간 상호작용 (cell-cell interaction) 또는 밀착 연결 (tight-junction)과 관련된 ECAD와 ZO1도 잘 발현하였으며, 형태학적으로도 오가노이드가 위 조직 구성 세포로 이루어져 있으며 상피조직 (epithelium)의 형상이 잘 유지되고 있음을 확인하였다 (도 14 (B)).
- [0159] 따라서 탈세포 위 조직 유래 SEM 하이드로젤이 기존의 배양 지지체인 매트리젤과 비교하여, 위 오가노이드를 비슷한 수준으로 배양할 수 있는 지지체임을 확인하였다.
- [0161] **실험예 2-5. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물과 기존 배양 지지체에서 배양된 위 오가노이드의 산 분비 비교 분석**
- [0162] 본 발명의 하이드로젤 지지체에서 5일 간 배양된 위 오가노이드의 기능성을 매트리젤에서 같은 기간 배양된 위 오가노이드와 비교 분석하였다.

- [0163] 구체적으로, Acridine Orange 염색 실험으로 위의 중요한 기능 중 하나인 산 분비 기능을 확인하였다.
- [0164] 그 결과, 도 15에서 확인된 바와 같이, 산성에 가까울수록 초록색 형광($F_{500-550}$) 세기는 약해지고 빨간색 형광($F_{600-650}$) 세기는 증가하였다. Acridine Orange 염색 후 형광 발현을 각 그룹마다 비교하였다. SEM 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드의 산 분비가 매트리젤에서 배양된 위 오가노이드와 비슷한 수준을 보이는 것을 확인하였다. 따라서 탈세포 위 조직 유래 지지체를 이용하여 배양한 위 오가노이드가 기존의 매트리젤에서 배양된 오가노이드를 대체하기에 기능적으로 문제가 없을 것으로 생각된다.
- [0166] **실험예 2-6. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물과 기존 배양 지지체 혼합에 의한 오가노이드의 분화 증진 효과 확인**
- [0167] 본 발명의 하이드로젤 지지체 조성물과 기존 배양 지지체 혼합에 의한 오가노이드의 분화 증진 효과를 확인하였다.
- [0168] 구체적으로, 기존의 위 오가노이드 배양 지지체인 매트리젤의 사용을 최대한 대체하면서 위 오가노이드의 분화를 더욱 증진시킬 수 있는 배양 시스템의 구축을 위해 SEM 하이드로젤과 매트리젤을 9:1(v/v)로 섞어서 새로운 배양 지지체로 테스트 진행하였다. 매트리젤 그룹은 대조군으로 이용하였다.
- [0169] 그 결과, SEM/MAT(9:1) 하이드로젤과 매트리젤에서 5일 간 배양된 위 오가노이드의 각 마커에 대한 mRNA 발현량을 비교한 결과, 줄기세포능(stemness)과 관련된 Lgr5의 발현도 유의미하게 증가할 뿐만 아니라, 특정한 위 조직 세포에서 발현되는 다양한 분화 마커 Gif (parietal cell)와 Pgc (chief cell)도 유의미하게 발현량이 증가한 것을 확인하였다. Pga5 (chief cell) 발현도 매트리젤에서 배양된 오가노이드에 비해 증가하였다 (도 16 (A)).
- [0170] 또한, SEM/MAT(9:1) 하이드로젤 지지체에서 5일 간 배양된 위 오가노이드의 면역염색을 통해 다양한 마커 단백질 발현을 확인한 결과, MUC5AC (gastric pit cell), CHGA (endocrine cell), HK (parietal cell), ECAD (epithelial cell)의 발현을 통해 위 오가노이드의 분화가 증진되면서 잘 형성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 16 (B)).
- [0171] 이러한 결과를 통해 SEM 기반 하이드로젤에 매트리젤을 소량 혼합해 주면 위 오가노이드의 증식 및 분화를 더욱 증진시킬 수 있는 배양 지지체의 구성이 가능함을 알 수 있다.
- [0173] **실험예 2-7. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물과 기존 배양 지지체 혼합에 의한 오가노이드의 기능 증진 효과 확인**
- [0174] 본 발명의 하이드로젤 지지체 조성물과 기존 배양 지지체 혼합에 의한 오가노이드의 기능 증진 효과를 확인하였다.
- [0175] 구체적으로, SEM/MAT(9:1) 하이드로젤 지지체에서 5일 간 배양된 위 오가노이드의 기능 증진 정도를 분석하였다. Acridine Orange 염색 실험으로, 위의 중요한 기능 중 하나인 산 분비 기능을 확인하였다. 매트리젤 그룹은 대조군으로 이용하였다.
- [0176] 그 결과, 도 17에서 확인되는 바와 같이 Acridine Orange 염색 후 형광 발현을 각 그룹마다 비교하였다. SEM/MAT(9:1) 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드의 산 분비가 매트리젤에서 배양된 위 오가노이드보다 유의미하게 증진된 것을 확인하였다. 본 실험을 통해 탈세포 위 조직 유래 SEM 하이드로젤 지지체를 혼합하면 기능적으로 더 우수한 위 오가노이드를 제작할 수 있는 가능성을 확인하였다.
- [0178] **실험예 2-8. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물의 조직 특이적 효과 확인**
- [0179] 탈세포 위 조직 유래 지지체에 포함된 위 특이적 세포외기질 성분들이 위 오가노이드 배양에 있어 조직 특이적 효과를 보여주는지 확인하기 위해 다른 장기 유래 탈세포 지지체에서 위 오가노이드를 배양하고 비교하는 실험을 수행하였다.
- [0180] 구체적으로, 각 조직 유래 탈세포 지지체에서 위 오가노이드를 5일 간 배양한 후 다양한 분석을 진행하였다.

- [0181] 그 결과, 위, 장, 피부, 림프, 심장, 근육 유래 탈세포 지지체를 이용하여 배양 시도한 결과, 위 및 장 유래 탈세포 지지체에서 위 오가노이드가 잘 형성된 것을 확인하였다. 반면 피부와 같은 다른 조직 유래 탈세포 지지체의 경우 위 오가노이드가 제대로 형성이 되지 않은 것을 확인하였다 (도 18 (A)).
- [0182] 오가노이드 형성 효율을 정량 분석해 보았을 때, 위와 장 유래 탈세포 지지체는 비슷한 형성 효율을 보이는 것을 확인한 반면에 피부 조직 유래의 탈세포 지지체의 경우 형성 효율이 감소하는 것이 관찰되었다 (도 18 (B)).
- [0183] 각 장기 유래 탈세포 지지체에서 5일동안 배양된 위 오가노이드의 마커 mRNA 발현을 비교한 결과 Stemness와 관련된 *Lgr5*의 발현양이 피부 조직 유래 지지체에서 배양된 오가노이드에서는 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다 (도 18 (C)).
- [0184] 본 실험을 통해 위 오가노이드 배양에 있어 위 조직 유래 탈세포 지지체가 가지는 조직 특이적 효과를 확인할 수 있었고 위와 유사한 소화기 조직인 장 유래 탈세포 지지체도 비슷한 효과를 보이는 것을 확인하였다.
- [0186] 한편, 탈세포 위 조직 유래 지지체 (SEM)와 탈세포 피부 조직 유래 지지체 (SkEM) 내에 포함된 ECM 단백질의 상대적인 정량을 통해, 탈세포 위 조직 유래 지지체의 조직 특이적인 효과를 확인하고자 하였다.
- [0187] 그 결과, 도 19에서 확인되는 바와 같이 SEM과 SkEM에서 검출된 총 55개의 세포외기질 단백질을 비교해 보았을 때, 41개의 세포외기질 단백질이 SkEM에서 보다 SEM에 더욱 많이 포함되어 있는 것을 알 수 있다. 이 중 오가노이드의 발달에 중요하다고 알려진 fibronectin, laminin 등의 주요 세포외기질 성분이 SEM에 더 많이 포함되어 있기 때문에 SEM이 위 오가노이드의 배양에 더욱 적합할 것으로 판단되었다.
- [0189] **실험예 2-9. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물의 조직 연령에 따른 세포외기질 성분 차이 분석**
- [0190] 본 발명의 지지체 조성물의 조직 연령에 따른 세포외기질 성분 차이를 분석하였다.
- [0191] 구체적으로, 어린 돼지 위 조직에서 유래한 SEM 하이드로젤 (Piglet)과 성체 돼지 위 조직에서 유래한 SEM 하이드로젤 (Adult pig)에서 위 오가노이드를 배양했을 때 위 오가노이드의 유전자 발현 차이와 각 하이드로젤에 포함된 세포외기질 단백질 성분의 차이를 분석하였다.
- [0192] 각 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드의 유전자 발현 차이를 qPCR 실험을 통해 분석한 결과 Piglet 위 조직 유래 지지체에서 배양된 위 오가노이드가 adult pig 위 조직 유래 지지체에서 배양된 위 오가노이드에 비해 전체적으로 증가된 줄기세포 및 분화 마커 발현을 보이는 것을 확인하였다 (도 20 (a)).
- [0193] 각 하이드로젤에 포함된 세포외기질 단백질 성분의 상대 정량 비교를 통해 piglet 위 조직 유래 지지체가 adult pig 위 조직 유래 지지체에 비해 상대적으로 많은 양의 세포외기질 단백질을 포함하고 있는 것을 확인하였다. 특히, fibronectin 및 laminin과 같은 주요 세포외기질 성분이 piglet 조직 유래 지지체에 더 풍부하게 포함되어 있기 때문에, 어린 개체의 조직으로부터 제작된 지지체가 위 오가노이드의 형성 및 분화에 더 효과적임을 알 수 있다 (도 20 (b)).
- [0195] **실험예 2-10. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물에서 위 오가노이드 장기 배양을 위한 배양액 조건 최적화**
- [0196] 본 발명의 지지체 조성물에서 위 오가노이드 장기 배양을 위한 배양액 최적화 조건을 선정하였다.
- [0197] 구체적으로, 도 21 (a)에서 확인되는 바와 같이 기존의 배양액 조성(검정색 표기 시약)에 추가적으로 첨가하는 인자(빨간색 표기 시약)를 조정하면서 실험하였다.
- [0198] 그 결과 도 21 (b)에서 확인되는 바와 같이, 기존의 배양액 조성(Conv), A83-01 추가한 조성(Conv + A), Nicotinamide 추가한 조성(Conv + Ni), 그리고 둘 다 추가한 조성(Conv + A + Ni)에서 각각 위 오가노이드의 장기 배양을 시도하였다. 계대 배양이 최대 3회 실행된 횟수를 조사하고 오가노이드 형태 분석을 통해 기존 배양액 조건과 추가 인자를 하나씩만 첨가한 배양액 조건에서는 모두 장기간 계대 배양이 가능하지 않았다. 하지만 A83-01과 Nicotinamide를 모두 첨가한 개선된 배양액 조건에서는 계대 배양이 최소 8회 이상 가능한 것을 확인하였다.

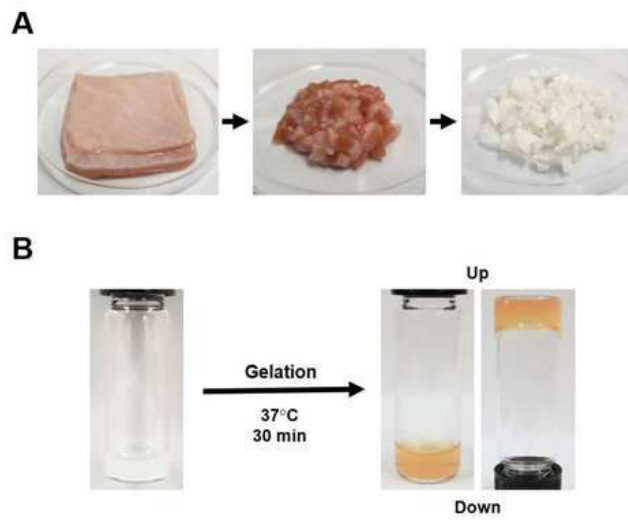
- [0200] 실험예 2-11. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물에서 위 오가노이드 장기 배양
- [0201] 상기 실험예에서 확립한 배양액 조건 하에서 탈세포 위 조직 유래 지지체 내에서 위 오가노이드 장기 배양 시도 및 다양한 stemness 마커를 분석하였다. 매트리젤 그룹은 대조군으로 이용하였다.
- [0202] SEM 하이드로젤에서 계대 배양을 지속하면서 2달가량 (61일) 배양했을 때 위 오가노이드 형태 이미지에서 확인되는 바와 같이 매트리젤에서 배양된 위 오가노이드와 마찬가지로 구형의 모양이고 크기도 유사한 수준으로 계속 유지되며 배양되는 것을 확인하였다 (도 22 (A)).
- [0203] 배양 5일차 때와 11일차에 SEM 하이드로젤과 매트리젤에서 배양된 위 오가노이드의 stemness관련 mRNA 발현 양상을 비교하였다. 줄기세포 마커(stemness)와 관련 있는 Lgr5, Axin2, Olfm4 유전자의 발현이 매트리젤 그룹보다 비슷하거나 더 높게 발현되면서 유지되는 것을 확인하였다 (도 22 (B)).
- [0204] 각각 계대 배양을 8회 시도한 뒤 45일차에, SEM 하이드로젤 그룹과 MAT 매트리젤 그룹의 Lgr5, Axin2, Olfm4 발현양을 비교해 보았을 때도 SEM 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드에서 비슷하거나 더 높은 수준으로 유지되고 있는 것을 확인하였다 (도 22 (C)).
- [0205] 이를 통해 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체에서 위 오가노이드가 최소 2달 이상 장기 배양 가능하고, 같은 배양 기간동안 매트리젤에서 배양된 오가노이드와 비교하여 비슷하거나 더 향상된 수준의 줄기세포능(stemness)을 지니고 있는 것을 확인하였다.
- [0207] 실험예 2-11. 탈세포 위 조직 유래 세포외기질의 지지체 조성물에서 배양된 위 오가노이드의 전사체(transcriptome) 발현 분석
- [0208] 본 발명 지지체 조성물에서 배양된 위 오가노이드의 전사체(transcriptome) 발현을 분석하였다.
- [0209] 구체적으로, SEM 하이드로젤에서 배양한 위 오가노이드의 유전자 발현을 RNA-sequencing 분석을 통해 확인하고, 매트리젤에서 배양된 오가노이드와 전사체 발현 정도를 비교하였다. 두 그룹을 비교했을 때, 발현양이 차가 나는 유전자 (Differentially Expressed Gene; DEG)를 선별하였고 이를 이용해 Gene Ontology 분석을 실시하였다.
- [0210] SEM 하이드로젤과 매트리젤에서 각각 배양한 위 오가노이드에서 모두 발현하는 유전자들 중에서, 2 fold, p-value < 0.05, FDR < 0.1의 통계적 기준으로 DEG 590개를 선별하여 heatmap으로 도식화 하였다. 두 오가노이드를 비교해 보았을 때 각 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드들이 형태는 유사하지만 상당히 많은 수의 유전자들의 발현이 차이를 보이는 것을 확인하였다 (도 23 (A)).
- [0211] Gene ontology 분석을 실시하여 SEM 하이드로젤 그룹에서 증가된 유전자 카테고리 (주황색)와 감소된 유전자 카테고리 (녹색)를 각각 분석하였다. 세포외영역 (extracellular region), 세포외영역 부분 (extracellular region part), 단백질성 세포외기질 (proteinaceous extracellular matrix), 세포외기질 (extracellular matrix) 등 세포외기질과 관련된 카테고리에 속하는 유전자들의 발현이 상당히 증가된 것을 확인할 수 있었다. 반면, 콜레스테롤 생합성 과정 (cholesterol biosynthetic process), 스테롤 생합성 과정 (sterol biosynthetic process), 스테로이드 대사 과정 (steroid metabolic process)등 지방 대사 관련된 유전자 발현의 감소가 가장 크게 관찰되었다 (도 23 (B)).
- [0212] 매트리젤 그룹보다 SEM 그룹에서 4배 이상 발현양이 증가된 DEG 유전자들을 총 28개 선별했을 때 대부분의 유전자들이 세포외기질 관련 유전자 카테고리에 포함되어 있는 것을 확인하여 세포외기질 관련 유전자들의 발현이 대폭 증가됨을 확인하였다. 특히, 증가된 28개의 유전자 중에 25개의 유전자가 세포외영역 (extracellular region) 카테고리에 포함되어 가장 크게 증가된 것을 확인하였다. 또한, 세포외영역 부분(extracellular region part) 관련 14개, 단백질성 세포외기질 (proteinaceous extracellular matrix) 관련 4개, 세포외기질 (extracellular matrix) 관련 4개, 세포 증식 조절 (regulation of cell proliferation) 관련 4개의 유전자가 포함되어 있는 것을 확인하여 SEM 하이드로젤이 매트리젤에 비해 위 오가노이드의 세포외기질 및 세포 증식 관련된 유전자들의 발현을 크게 증가시킨 것을 확인하였다 (도 23 (C)).

- [0214] 한편, 생쥐의 위조직의 전사체를 RNA-sequencing 분석을 통해 확인하고, 이를 각 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드의 전사체와 비교 분석하였다.
- [0215] 각 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드의 전사체를 생쥐 위조직과 비교하여 증가한 유전자들과 감소한 유전자들의 비율을 각 ontology 별로 나누어 나타낸 결과, Ontology는 세포외기질 및 세포-매트릭스 간의 상호작용과 관련된 단어들로 선별하여 분석을 진행하였다. 위 오가노이드가 대부분의 카테고리에서 위 조직에 비해서 발현양이 떨어지지만, SEM 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드가 매트릭스에서 배양된 위 오가노이드에 비해서 증가된 유전자의 개수가 더 많은 것을 확인하였다 (도 24 (a)).
- [0216] 개별적인 유전자로 분석해본 결과, 세포외기질 (extracellular matrix)에 관련된 *Nid1*, *Pxdn*, 위 상피세포 (gastric epithelial cell)와 관련된 유전자인 *Msi1*, *Dbn1*, *Chgb*, *Nrg1*, 그리고 호르몬 반응 (hormone activity)과 관련있는 *pyy*, *Cpt1c* 등의 유전자의 발현양이 SEM 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드에서 매트릭스에서 배양된 위 오가노이드 보다 더욱 높고, 위 조직의 발현양에 가까운 것을 확인할 수 있었다 (도 24 (b)).
- [0217] 이러한 전사체 분석을 통해서, SEM 하이드로젤에서 배양된 위 오가노이드가 매트릭스에서 배양된 위 오가노이드에 비해 더욱 위 조직과 가깝다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0219] **실험예 3: 지지체 조성물의 활용 가능성 검증**
- [0220] **실험예 3-1. 탈세포 위 조직 유래 지지체 조성물을 이용한 위 오가노이드 생체 내 이식**
- [0221] 본 발명의 하이드로젤 지지체를 위 오가노이드 이식용 소재로서 활용하기 위한 동물 실험을 수행하고 조직학 분석을 진행하였다.
- [0222] 구체적으로, 위 오가노이드를 마우스 위궤양 모델의 손상된 위 조직 내에 효율적으로 전달하고 생착시키기 위해 SEM 하이드로젤을 이용하여 위 오가노이드를 이식하였고, 이식 시 주사가 용이한 하이드로젤 점도를 맞추기 위해 SEM 하이드로젤은 1:20 (v/v) = SEM : 배양액 조성으로 혼합하여 사용하였다. 생체 내로 이식한 오가노이드의 추적에 위해 EGFP 발현 마우스 조직에서 추출된 줄기세포로 제작한 위 오가노이드를 이식에 이용하였다 또한, 쥐 위벽에 100% 아세트산을 capillary tube를 이용해 30초간 처리해주어 마우스 모델에서 위궤양을 유발하고, SEM 하이드로젤을 이용하여 위 오가노이드를 손상된 위 조직 부위에 이식한 후 오가노이드 생착 정도를 관찰하였다 (도 25 (a)).
- [0223] 마우스 위궤양 모델에 DiI 형광 dye로 표지된 위 오가노이드를 탈세포 SEM 하이드로젤 지지체를 이용하여 이식하고, 생착 여부를 이식 하루 뒤에 형광 발현을 통해 관찰한 결과, 위 조직 gland 부분에 전체적으로 이식된 오가노이드가 존재하는 것을 확인하였다. 오가노이드가 이식되지 않은 손상된 위 조직에서는 형광이 관찰되지 않았다 (도 25 (b)).
- [0224] 마우스 위궤양 모델에 EGFP를 발현하는 위 오가노이드를 탈세포 SEM 하이드로젤 지지체를 이용하여 이식하고, 생착 여부를 하루 뒤에 형광 발현을 통해 관찰한 결과, 마찬가지로 이식된 오가노이드가 손상된 조직 부위에 잘 생착하고 존재하는 것을 확인하였다 (도 25 (c)).
- [0226] **실험예 3-2. 장기보관 된 지지체 조성물을 이용한 위 오가노이드의 배양 가능성 검증**
- [0227] 장기보관 된 본 발명의 지지체 조성물에서 위 오가노이드 배양 가능성을 검증하였다.
- [0228] 구체적으로, SEM 용액을 -80℃에서 장기간 냉동 보관하고, 이를 해동하여 제작한 SEM 하이드로젤을 위 오가노이드 배양에 이용하여 장기 보관 가능성 및 안정성을 확인하였다 (도 26 (A)).
- [0229] 그 결과, 도 26 (B)에서 확인되는 바와 같이, 장기간 냉동 보관 후 해동된 SEM 하이드로젤에서도 위 오가노이드 배양이 잘되는 것을 확인하였고(배양 5일째 오가노이드 이미지), 오가노이드 형성 효율도 배양 직전에 새로이 제작된 SEM 하이드로젤 및 매트릭스와 비슷하게 유지되는 것을 확인하였다. 또한 줄기세포 마커 및 분화 마커의 mRNA 발현양 차이도 크게 차이가 나지 않았다. 이를 통해 탈세포 위 조직 유래 지지체가 냉동 조건(-80℃)에서 장기간 최소 6개월까지 보관되어도 변성 없이 안정적으로 유지되어 위 오가노이드 배양에 사용 가능한 것을 확인하였다. 장기간 보관이 가능함을 통해 유효기간이 긴 제품으로 개발될 수 있음을 검증하였다.

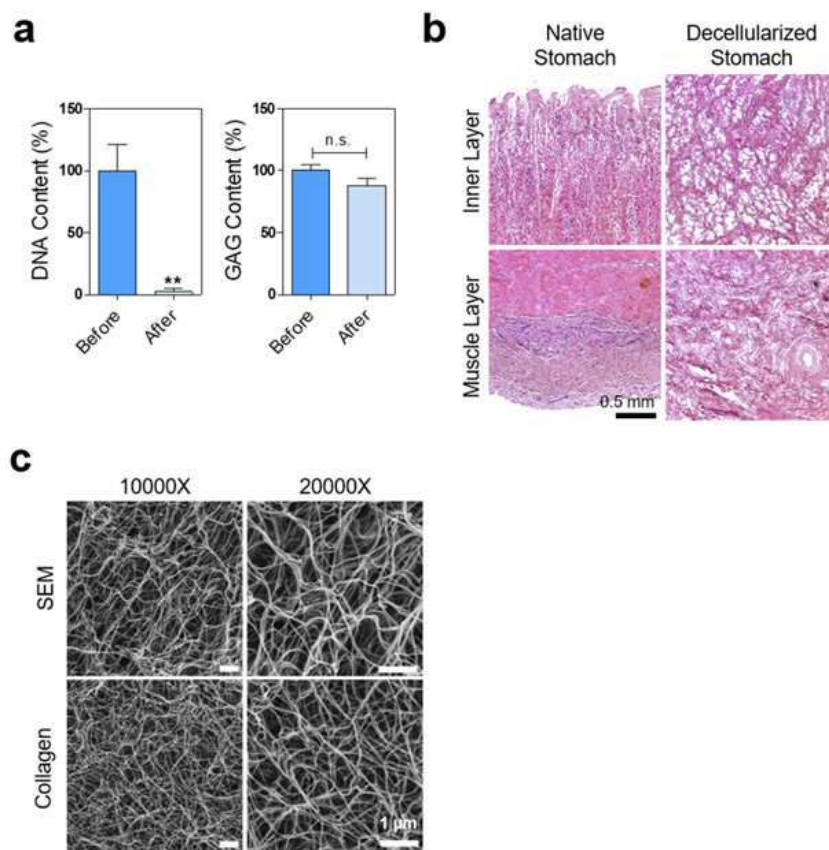
- [0231] 한편, SEM 용액을 4℃에서 냉장 보관하고, 이를 위 오가노이드 배양에 이용하여 장기 보관 가능 여부, 변성 여부 및 안정성을 확인하였다 (도 27 (A)).
- [0232] 그 결과, 도 27 (B)에서 확인되는 바와 같이, 배양 직전에 새롭게 제작한 SEM 하이드로젤 및 매트릭셀과 비교하여 냉장 보관된 SEM 용액으로 제작한 하이드로젤에서도 위 오가노이드가 비슷한 수준으로 잘 형성이 되며 유지, 배양이 잘 되는 것을 확인하였다(배양 5일째 오가노이드 이미지). 이를 통해 탈세포 위 조직 유래 지지체가 용액 형태로 4℃에 냉장 보관되어도 최소 1달까지 변성 없이 안정성을 잘 유지하며 냉장 보관 후에 위 오가노이드 배양에 사용 가능함을 확인하였다. 장기간 보관이 가능함을 통해 유효기간이 긴 제품으로 개발될 수 있음을 검증하였다.
- [0234] **실험예 3-3. 지지체 조성물에서 위암 오가노이드의 배양 가능성 검증**
- [0235] 본 발명의 지지체를 이용하여 위암 오가노이드의 배양 가능성을 확인하였다.
- [0236] 구체적으로, MKN-74, NCI-N87 위암 세포주를 SEM 하이드로젤에서 삼차원 배양했을 때 암 오가노이드가 형성됨을 확인하였다(배양 10일차 오가노이드 이미지 및 면역염색 분석).
- [0237] 그 결과, 도 28에서 확인되는 바와 같이, 광학 현미경 관찰을 통해 두 가지 위암 세포주로부터 SEM 하이드로젤 내에서 모두 오가노이드가 잘 형성된 것을 확인하였고, 면역염색으로 세포 증식과 관련된 Ki67 단백질을 염색하여 오가노이드 내 세포들의 증식이 활발히 일어나고 있는 것을 확인하였다.
- [0238] 본 실험을 통해 탈세포 위 조직 유래 SEM 하이드로젤 지지체는 줄기세포 유래의 위 오가노이드 뿐 아니라 위암 오가노이드의 배양도 가능함을 확인하여 SEM 하이드로젤이 위암 체외 모델 구축을 위한 배양 플랫폼의 요소 기술로 활용될 수 있는 가능성을 확인하였다.
- [0241] **실험예 3-4. 지지체 조성물과 미세유체 칩을 이용한 위 오가노이드 대량 배양 가능성 검증**
- [0242] 오가노이드 대량 배양과 다중 약물 스크리닝이 가능한 미세유체 칩에서 SEM 하이드로젤을 기반으로 하는 위 오가노이드 배양 플랫폼의 구축 가능성을 확인하였다. 미세유체 칩은 교반기(rocker)를 이용한 간단한 방식으로 미세한 배양액 흐름을 오가노이드에 제공해 줄 수 있다. 또한 다수의 챔버가 존재하여 오가노이드의 대량 생산이 가능하다 (도 29 (a)).
- [0243] 상기 장치에서 본 발명의 지지체를 이용하여 위 오가노이드를 배양하였다.
- [0244] 미세유체 칩 내에서 위 오가노이드가 봉입된 SEM 하이드로젤을 배양한 결과 오가노이드 배양 챔버에 미세한 배양액 흐름을 주며 5일 동안 배양했을 때, 1 mm 수준의 크기까지 위 오가노이드가 성장하며 잘 배양되는 것을 확인할 수 있었다 (도 29 (b)).
- [0245] 이러한 결과를 통해 탈세포 위 조직 유래 하이드로젤 지지체 내에 삼차원 배양되는 위 오가노이드는 미세유체 칩 기술과 접목이 되면 조직 특이적 세포외기질 미세환경과 정밀한 미세유체 흐름의 동적 배양이 결합되어 효율적인 오가노이드 대량 생산이 가능함을 알 수 있다.
- [0247] 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

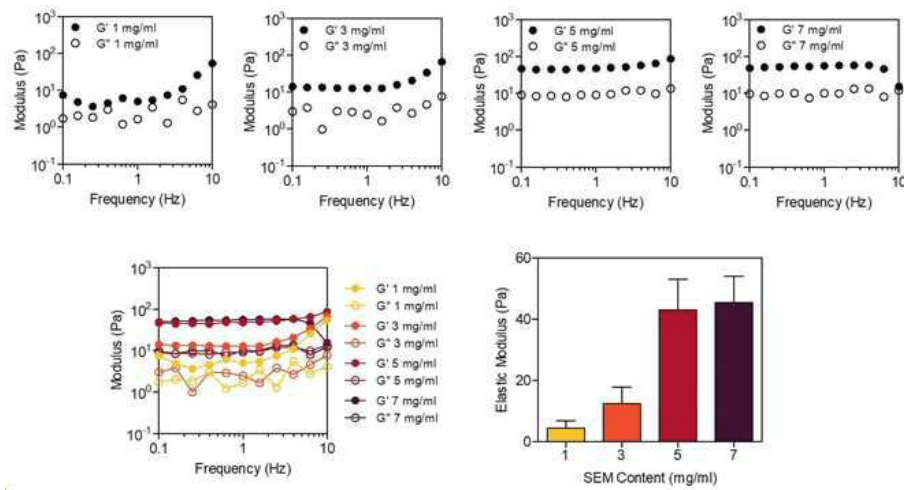
도면1



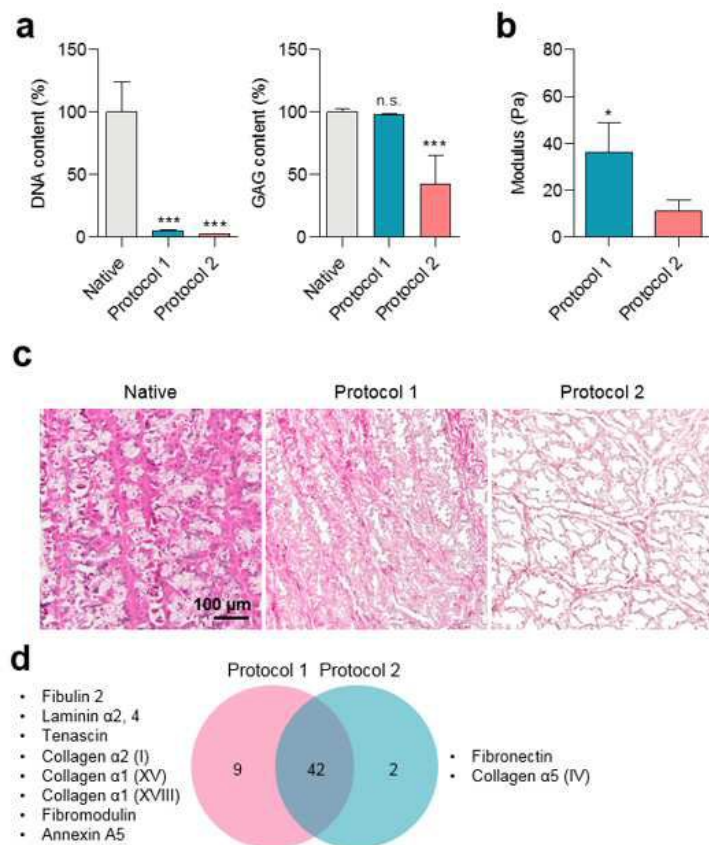
도면2



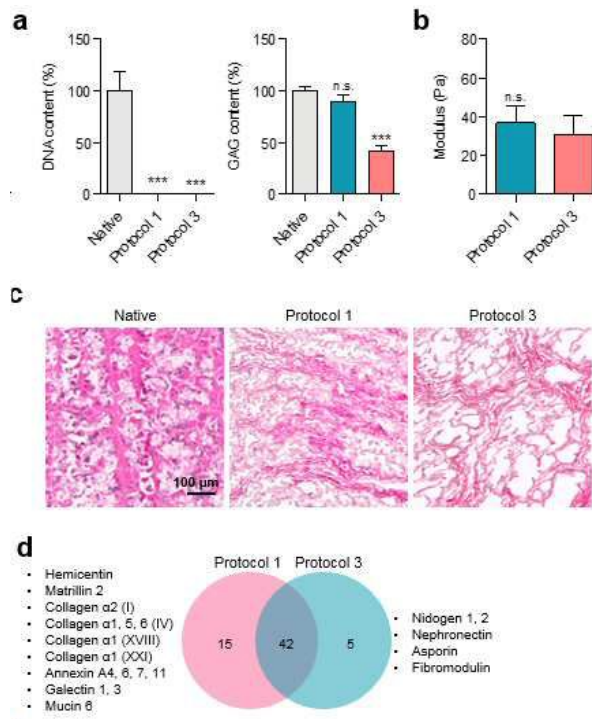
도면3



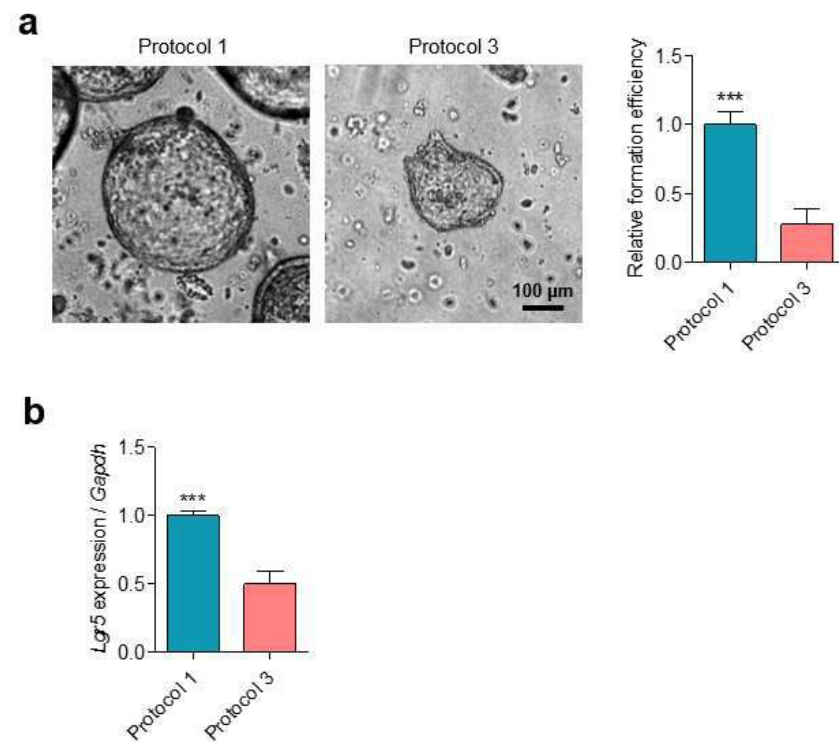
도면4



도면5



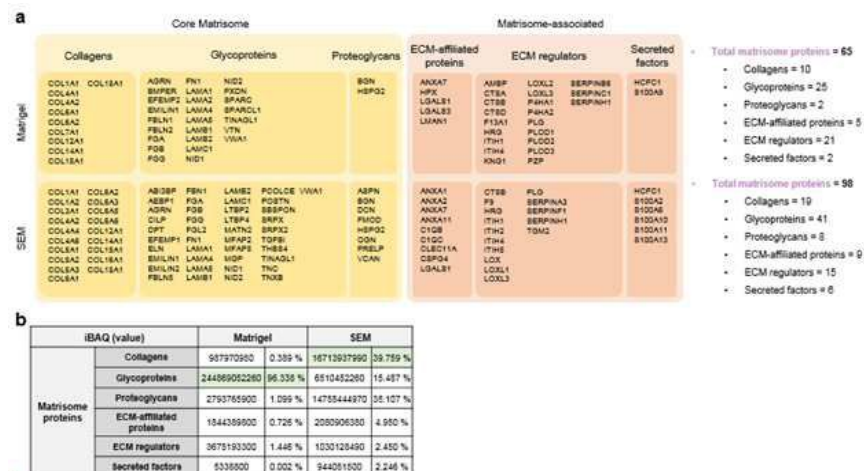
도면6



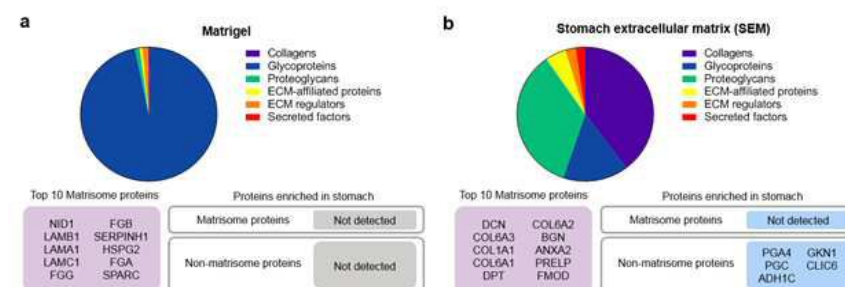
도면7

	Stomach 1	Stomach 2	Stomach 3	Stomach 4
Collagens	Collagen type IV, alpha 2	Collagen type IV, alpha 2	Collagen type I, alpha 1	Collagen type I, alpha 1
	Collagen type VI, alpha 1, 2, 3, 5	Collagen type V, alpha 1	Collagen type III, alpha 1	Collagen type III, alpha 1
	Collagen type XII, alpha 1	Collagen type VI, alpha 1, 2, 3, 5, 6	Collagen type IV, alpha 1, 2	Collagen type IV, alpha 1, 2
	Collagen type XIV, alpha 1	Collagen type XII, alpha 1	Collagen type VI, alpha 1, 2, 3, 5, 6	Collagen type VI, alpha 1, 2, 3, 5, 6
	Collagen type XV, alpha 1	Collagen type XIV, alpha 1	Collagen type XII, alpha 1	Collagen type XII, alpha 1
	Collagen type XVIII, alpha 1	Collagen type XV, alpha 1	Collagen type XIV, alpha 1	Collagen type XIV, alpha 1
		Collagen type XVIII, alpha 1	Collagen type XV, alpha 1	Collagen type XV, alpha 1
		Collagen type XVIII, alpha 1	Collagen type XVIII, alpha 1	
			Collagen type XXI, alpha 1	
Proteoglycans	Heparan sulfate	Heparan sulfate	Heparan sulfate	Heparan sulfate
	Asporin	Asporin	Asporin	Asporin
	Decorin	Biglycan		Biglycan
	Fibromodulin	Decorin	Decorin	Decorin
	Lumican	Fibromodulin	Fibromodulin	Fibromodulin
	Versican	Versican	Versican	
	Lumican	Lumican	Lumican	
Glycoproteins	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin	Fibronectin
	Laminin, alpha 4, 5	Laminin, alpha 4, 5	Laminin, alpha 2, 4, 5	Laminin, alpha 2, 4, 5
	Laminin, beta 2	Laminin, beta 1, 2	Laminin, beta 1, 2	Laminin, beta 1, 2
	Laminin, gamma 1	Laminin, gamma 1	Laminin, gamma 1	Laminin, gamma 1
	Nidogen 1, 2	Nidogen 1, 2	Nidogen 1, 2	Nidogen 1, 2
	Thrombospondin 9	Thrombospondin 3	Thrombospondin 4	Thrombospondin 4
	Emilin 1	Tenascin	Vitronectin	Vitronectin
	Fibulin 1, 5	Emilin 1	Tenascin X	Tenascin X
	Fibrinogen, alpha chain	Fibrinogen, alpha chain	Emilin 1	Emilin 1
	Fibrinogen, beta chain	Fibrinogen, beta chain	Fibulin 1, 2	Fibulin 1, 2, 5
	Fibrinogen, gamma chain	Fibrinogen, gamma chain	Fibrillin 1	Fibrinogen, alpha chain
	Elastin	Elastin	Fibrinogen, alpha chain	Fibrinogen, beta chain
		Hemicentin 2	Fibrinogen, beta chain	Fibrinogen, gamma chain
			Fibrinogen, gamma chain	Elastin
			Elastin	Dermatopontin
		Dermatopontin		
		Hemicentin 2		
Others	Prolargin	Prolargin	Prolargin	Prolargin
	Mimecan	Mimecan	Mimecan	Mimecan

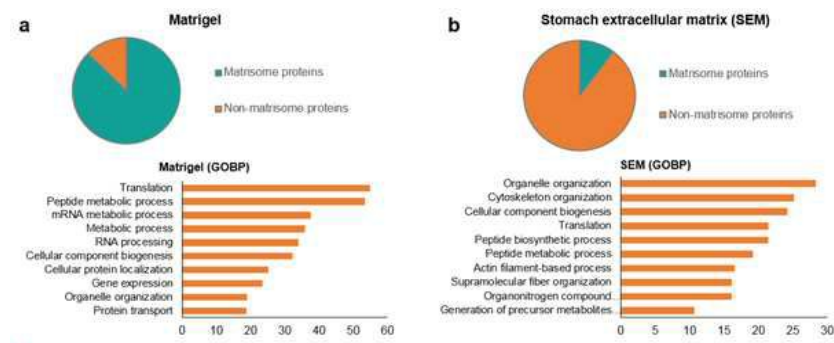
도면8



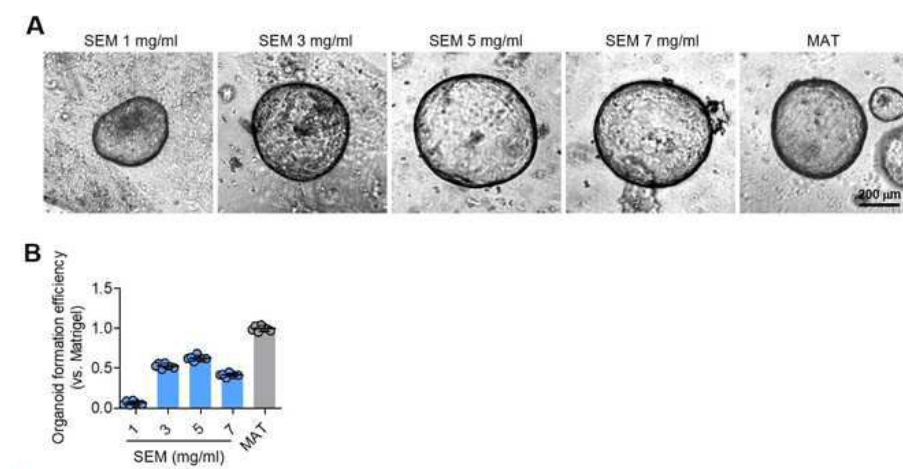
도면9



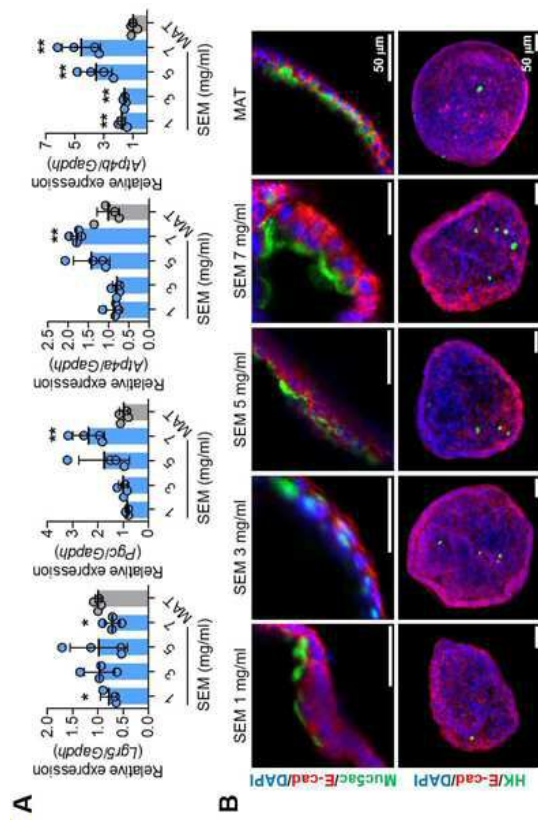
도면10



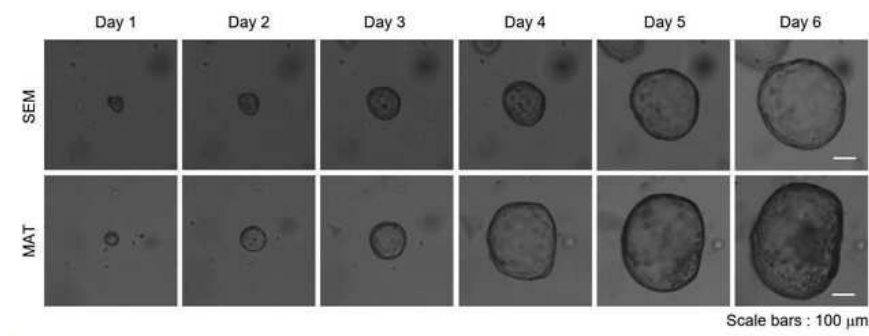
도면11



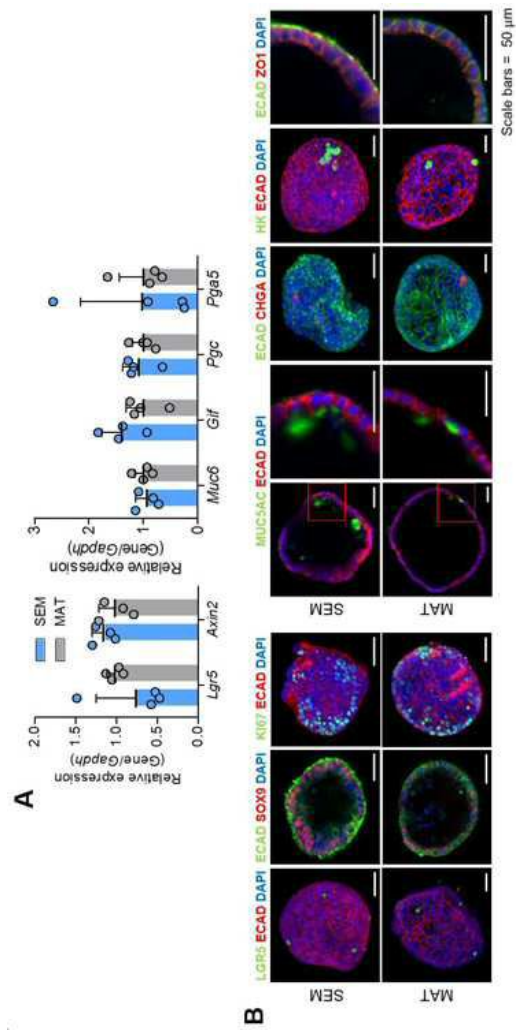
도면12



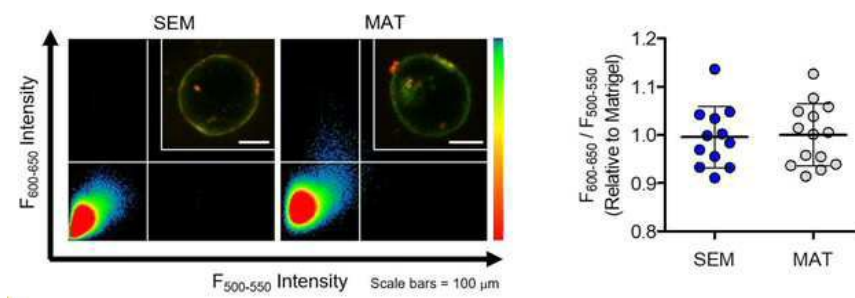
도면13



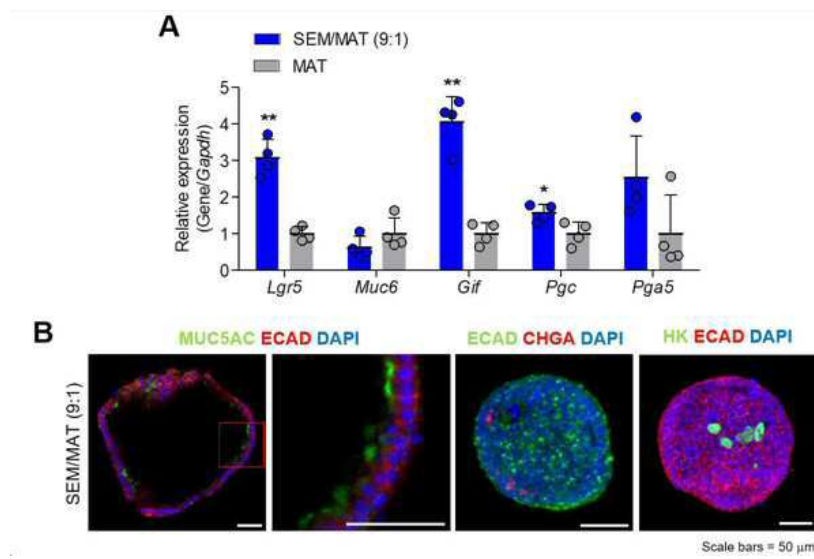
도면14



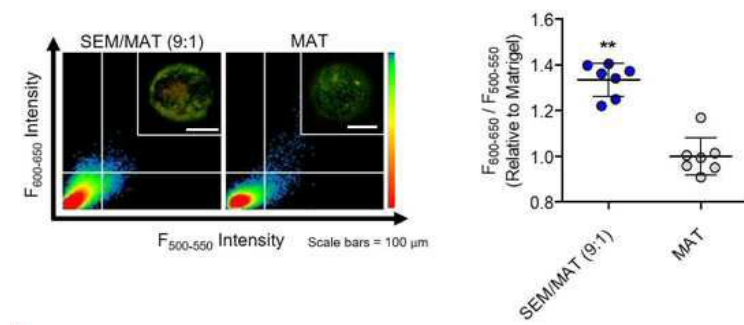
도면15



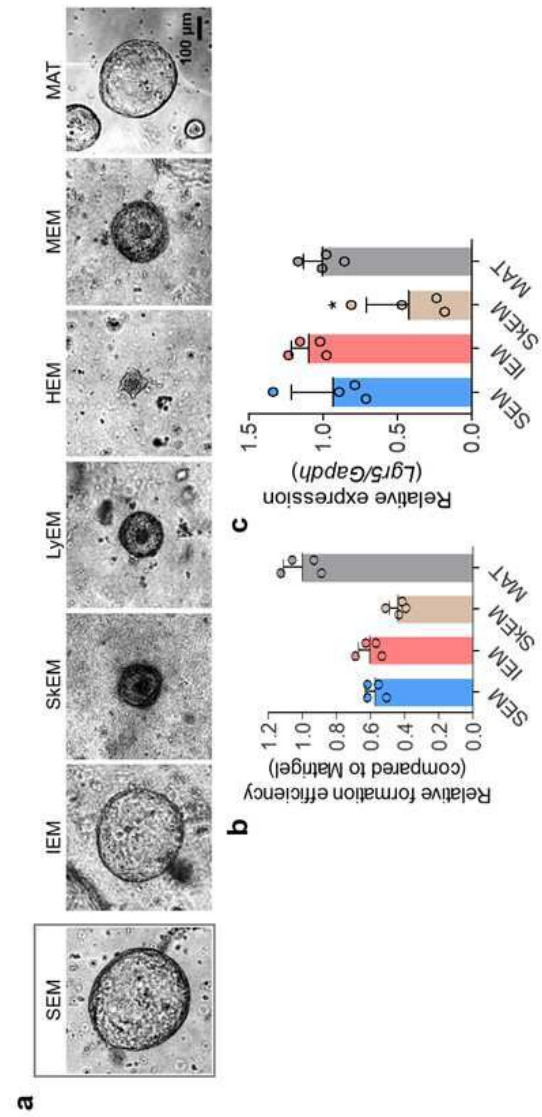
도면16



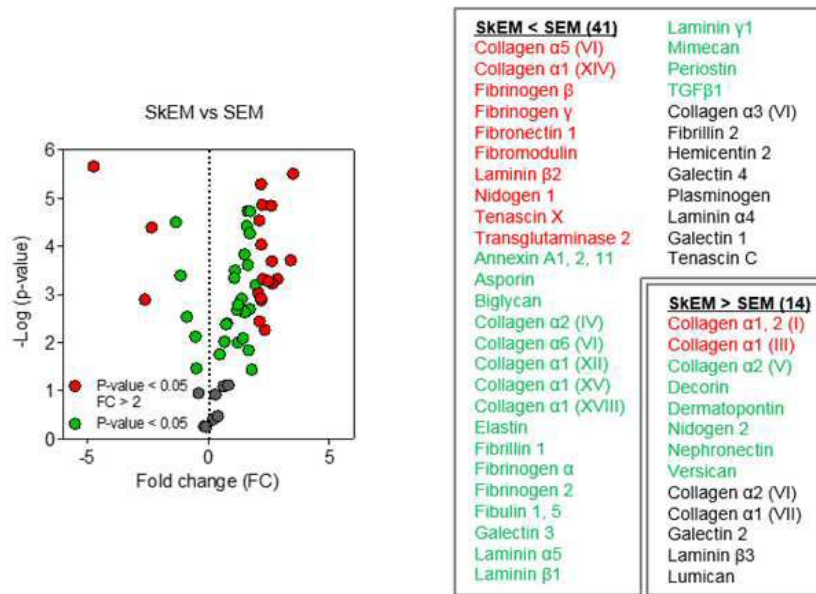
도면17



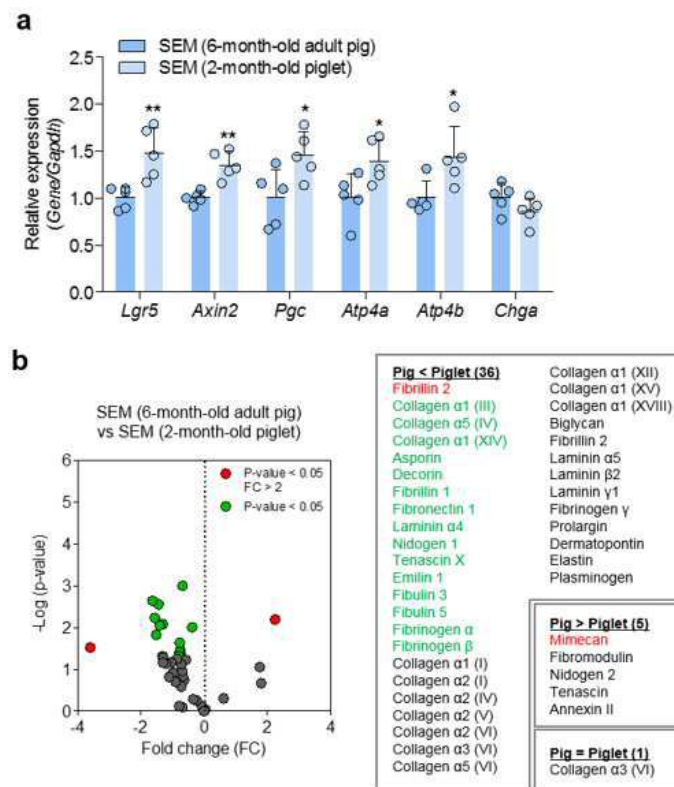
도면18



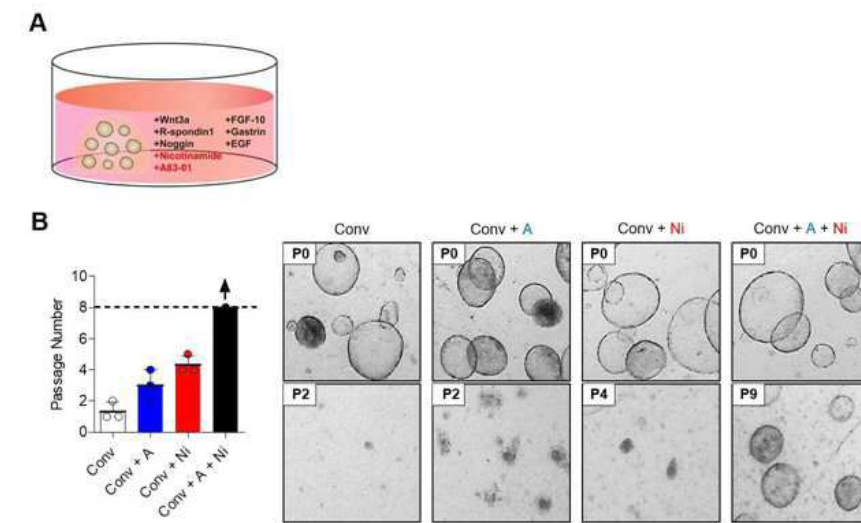
도면19



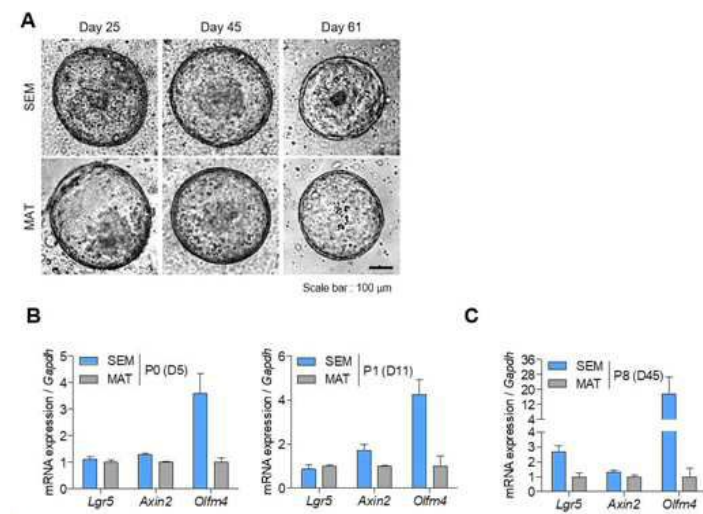
도면20



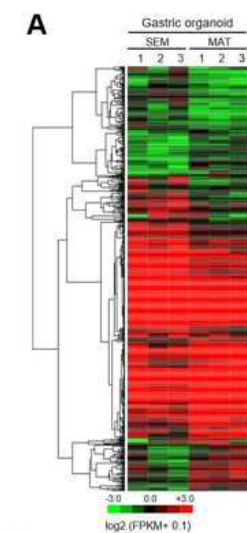
도면21



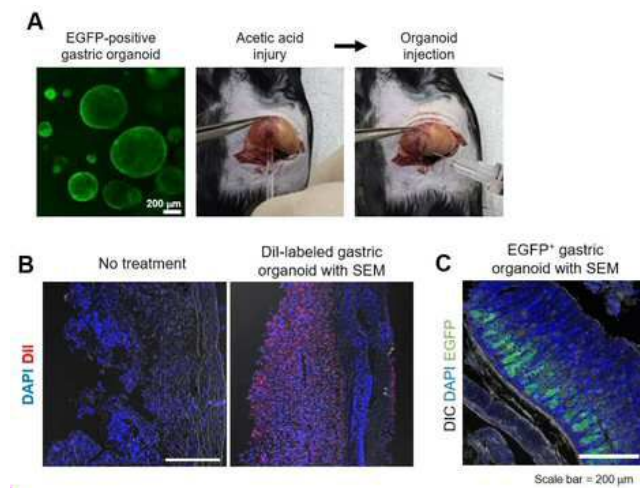
도면22



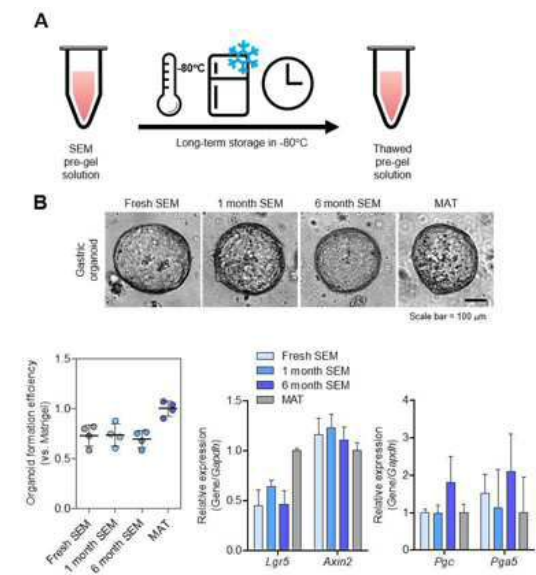
도면23a



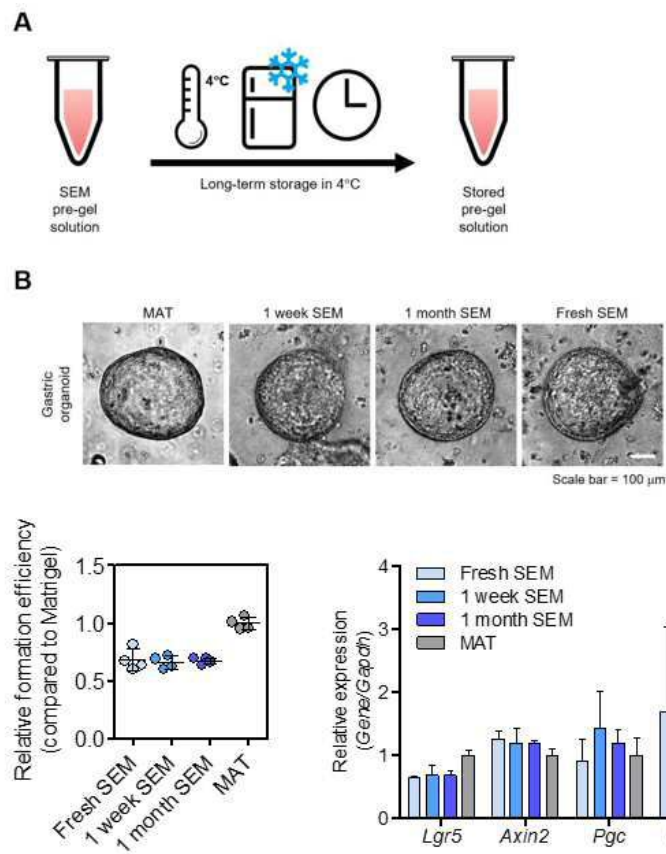
도면25



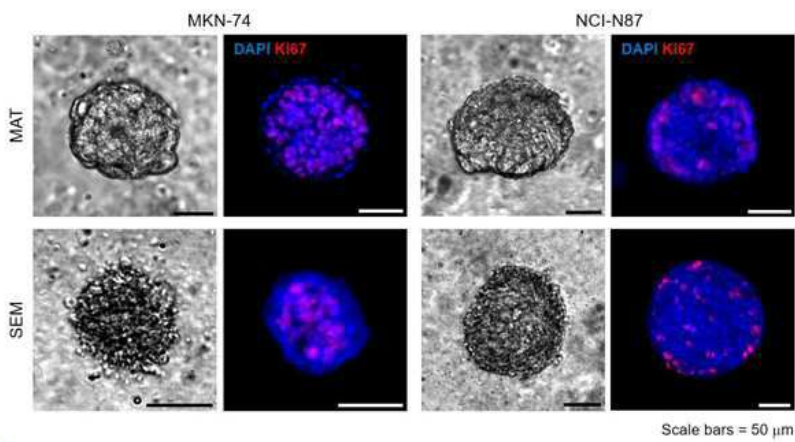
도면26



도면27



도면28



도면29

