



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월23일

(11) 등록번호 10-2218303

(24) 등록일자 2021년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/37 (2015.01)

A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)

G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0697 (2013.01)

A61K 35/37 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0104325

(22) 출원일자 2019년08월26일

심사청구일자 2019년08월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180115236 A*

WO2018229251 A1*

DEVELOPMENT, vol.146(8),

pp.1~13(2019.04.16.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

주식회사 마이크로바이오틱스

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 221호(신촌동, 연세대학교의과대학 임상의학연구센터)

(72) 발명자

용동은

서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705

박철순

충청북도 충주시 신호5길 1

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 혈관 조직을 포함하는 오가노이드의 제조 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 혈관 조직을 포함하는 오가노이드, 특히는 장관 오가노이드의 제조 방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 제조 방법은 후장 세포(hindgut cell)와 혈관 조직을 공배양(co-culture)하는 단계를 포함할 수 있다.

대표도 - 도1

Day	D1	D3	D5	D7	D9	D11	D13	D15	D17
Factors	CHIR-99031		WSP-A VSP-A		WSP-A VSP-A		10% FBS WSP-A VSP-A		3D Co-culture (Hind gut)
Stage	Midgut		Vascular Image Promotion				Vascular Network		
DMEM F12 Media + Knock-out Serum Replacement 20%									
Day	D17	D19	D21	D23	D25	D27	D29	D31	D33
Factors			WSP-A VSP-A CHIR-99031 WSP-A VSP-A				WSP-A VSP-A CHIR-99031 WSP-A VSP-A		
Stage			Contact of the colon with Vascular				Subculture and Long-term culture		
DMEM F12 Media + Knock-out Serum Replacement 20%									

(52) CPC특허분류

A61L 27/3625 (2013.01)
A61L 27/3679 (2013.01)
A61L 27/3804 (2013.01)
A61L 27/3882 (2013.01)
A61L 27/3895 (2013.01)
C12N 5/0679 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
C12N 2500/02 (2013.01)
C12N 2501/119 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	H-GUARD_2014M3A6B2060509
부처명	Ministry of Science, ICT & Future Planning (MSIP)
과제관리(전문)기관명	Global Frontier Project
연구사업명	감염질환 진단검사 평가를 위한 기반 시스템 구축(Development of software and diagnostic test evaluation system for patients with infectious diseases)
연구과제명	BioNano Health-Guard Research Center
기 여 율	1/2
과제수행기관명	Yonsei University Office of Research affairs/ University Industry Foundation
연구기간	2014.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	918003-4
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	포스트게놈 신산업육성을 위한 다부처유전체사업
연구과제명	감염 억제 및 장 염증 완화 기능 프로바이오틱스 균주 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.04.25 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

후장 세포(hindgut cell)와 혈관 조직을 공배양(co-culture)하는 단계를 포함하고,

상기 후장 세포는 줄기세포에 액티빈(activin) 및 CHIR99021을 처리하여 내배엽성 세포로의 분화를 유도한 뒤 상기 내배엽성 세포에 CHIR99021 및 FGF4를 처리하여 분화 유도된 것이고,

상기 혈관 조직은 줄기세포를 5 부피% CO₂ 조건 하에서 배양하여 분화 유도된 중배엽성 세포에 FGF4, BMP4, VEGFA 및 SB43152를 처리하여 5 부피% CO₂ 조건 하에서 배양하여 혈관계 세포(vascular lineage)의 분화를 유도한 뒤 FGF4 및 VEGFA를 처리하여 배양해 얻어진 것인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 중배엽성 세포는 적어도 하나의 Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator)의 존재 하에서 줄기세포를 배양하여 분화 유도된 것인, 제조 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021, BIO((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime), BIO-아세톡심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime), 3F8(5-Ethyl-7,8-dimethoxy-H-pyrrolo[3,-4-c]isoquinoline-1,3(2H)-dione), A070722(1-(7-Methoxyquinoiin-4-yl)-3-[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea), AR-A014418(N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N'-(5-nitro-2-thiazolyl)urea), SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione), SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), TC-G24(N-(3-Chloro-4-methylphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyl)phenyl]-5-benzofuranyl]-1,3,4-oxadiazole) 및 TWS119(3-[[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,-3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 제조 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 혈관 조직은 상기 FGF4 및 VEGFA의 존재 하에서 상기 혈관계 세포를 3차원 배양하여 얻어진 혈관망 조직을 포함하는, 제조 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

제1항에 있어서,

상기 공배양은 Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator), 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 인자(growth factor) 중 적어도 하나의 존재 하에서 수행되는, 제조 방법.

청구항 23

제1항에 있어서,

상기 공배양은 3차원 배양 방법에 의해 수행되는, 제조 방법.

청구항 24

제1항에 있어서,

상기 공배양 후 얻어진 장관 오가노이드를 계대 배양하여, 상기 장관 오가노이드의 성숙을 유도하는 단계를 더 포함하는, 제조 방법.

청구항 25

제1항, 제17항, 제18항, 제20항 및 제22항 내지 제24항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 혈관 조직을 포함하는 장관 오가노이드.

청구항 26

제25항의 장관 오가노이드를 포함하는 조직 치료제.

청구항 27

제25항의 장관 오가노이드를 이용하여 장 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 방법은 상기 오가노이드에 피검 물질을 처리하는 단계; 및

상기 피검 물질의 처리 후 장 관련 질환의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA의 발현이 처리 전과 비교하여 증가 또는 감소되는 경우, 상기 피검 물질을 장 관련 질환의 치료제로 선별하는 단계를 포함하는, 스크리닝하는 방법.

청구항 29

제27항에 있어서,

상기 장 관련 질환은 염증성 장 질환(IBD), 과민성 대장 증후군(IRS), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(UC), 단장 증후군(short bowel syndrome), 장염 (enterocolitis), 유전적 장질환인 히르슈슈프룽 병(hirschsprung's disease) 및 셀리악 병(Celiac disease)으로부터 선택되는 것인, 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관 조직을 포함하는 오가노이드, 특히는 장관 오가노이드의 제조 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오가노이드(organoid)는 장기 유사체로서, 줄기세포나 장기 기원세포로부터 분리한 세포를 3D 배양을 통해 다시 응집·재조합하여 만든 조직 또는 기관의 형태와 기능 모두를 재현하는 작은 배양체를 의미한다. 이러한 오가노이드는 기관 또는 조직을 구성하는 여러 특이적 세포 집단들을 포함하고 있고, 실제 조직 또는 기관과 유사한 형태 및 구조적 조직화가 이루어져 있으며, 각 기관이 가지는 특수한 기능을 재현할 수 있다. 오가노이드는 공통적인 일련의 과정에 의해 형성되는데, 기능이 같은 세포들끼리 뭉쳐 적절한 위치로 배치되며, 세포들의 구획이 분리된 후에는 더욱 세부적인 분화가 일어난다. 이를 계통 특성화(lineage specification)라고 하며, 실제 기능을 수행할 수 있도록 전구체가 완전한 성체 세포로 분화되는 것이다.

[0003] 효과적인 오가노이드 대량 배양 기술의 개발은 다양한 응용 분야로 접목되어 질병 모델링, 약물 효력 테스트, 장기 대체 치료법(organ replacement) 등에 활용될 수 있다. 오가노이드는 맞춤형 의료(personalized medicine)의 강력한 모델로, 2차원에서 만든 세포 조직보다 신약의 안전성과 효능을 시험하는데 더욱 효과적이며, 환자 또는 개인별로 가장 적절한 약물을 선택하도록 도와줄 수 있을 것으로 기대되고 있다. 또한, 치료 용도로 활용되어 질환으로 손상되거나 제대로 발달하지 못한 장기에 오가노이드를 이식해 상태를 개선할 수 있다.

이러한 오가노이드의 제작 기술은 이론적으로는 줄기세포만으로 거의 모든 종류의 장기를 제작 가능한 것으로 알려져 있고, 따라서 다양한 질병에 이용 가능할 것으로 기대되어 최근 재생의학 분야에서 관련 연구가 더욱 활발해지는 추세이다.

[0004] 기존의 장 오가노이드는 2009년 Hans Clevers 연구실에서 분리된 장 줄기세포를 마트리젤을 이용한 3차원 배양에 처음으로 성공하여 장 줄기 세포로부터 생체 내 장의 구조와 비슷하게 장선화-용털 구조를 가지고 있는 장 오가노이드를 스스로 형성한다는 것을 보여준 바가 있으며, 이렇게 형성된 장 오가노이드는 배양되는 수 년 동안 그 성질이 유지될 수 있다고 보고되었다. 이러한 오가노이드는 장 내 줄기세포인 성체줄기세포를 이용하여 생산되며, 성체 줄기세포로부터 유래한 오가노이드는 조직이 자기복제 되거나 손상으로부터 회복될 때 체내 줄기 세포가 갖는 niche 환경을 모방하면 분화된 세포가 형성될 수 있다. 특히 상피 성체 줄기세포의 정상적인 역할 수행에는 윈트(Wnt) 신호가 아주 중요하다. 그러므로 Wnt 신호의 활성화물질인 Wnt3a, R-스폰딘(R-spondin) 등은 성체 줄기세포 배양 프로토콜에 주요한 요소로 포함되며, 이런 배양환경에서 Lgr5+ 세포가 항상 나타나게 된다. 여기서 Lgr5는 Wnt 신호의 표적 유전자이자 Wnt 신호를 증폭시키는 R-spondin의 수용체로 작동하는 인자이고, 성체 줄기세포의 활성도를 나타내는 지표이기도 하다. Lgr5+ 세포는 대부분의 조직 및 장기에서 유래한 오가노이드 형성에서 관찰되는 매우 중요한 성체줄기세포이다. 하지만 얻을 수 있는 세포 수에 한계가 있어 효율적 생산과 연구에 제한이 있으므로, 장의 발달, 분화 및 성숙에 대한 연구에 있어 새로운 모델이 필요하다.

[0005] 최근에는 인간 배아 줄기세포(human embryonic stem cells; hESC)와 인간 유도 다능성 줄기세포(human induced pluripotent stem cells; hiPSC) 같은 인간 다능성 줄기세포(human pluripotent stem cells; hPSC)로부터 직접적인 분화(directed differentiation) 프로토콜을 사용하여 3차원 인간 장관 오가노이드(human intestinal organoids; hIO)를 제작함으로써 생체 외(in vitro)에서 미니 장관 또는 장관 조직 제작 방법이 개발되었다(Spence et al., Nature 2011). 그러나 이렇게 제작된 hIO와 성숙한 인체의 소장 대조군(hSI, human small intestine)의 구조와 기능이 크게 유사함에도 불구하고, hPSC에서 유래한 hIO는 소화 기능, 면역 기능 및 OLFM4와 같은 장관 줄기세포(intestinal stem cell) 마커 유전자의 발현이 충분하지 않은 미성숙한 태아(fetus) 소장의 특성을 가진다. 이는 생체 외(in vitro)에서 성숙에 제한된 시간이 허여된 것과, 장내 성숙에 중요한 소장 주위의 적절한 신호 및/또는 면역, 혈관, ENS 전구세포 같은 중요한 세포 유형의 부족에 의한 것으로 추정된다. 이 미성숙 hIO는 신장주머니에 이식된 후 생체 내(in vivo) 환경에서 배양되거나 또는 마우스의 기형종으로 성장한 경우에만 성체의 장관 구조 및 기능성을 갖춘 성숙한 소장으로 발달할 수 있다는 문제점을 가지고 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 혈관 조직을 포함하는 오가노이드를 효과적으로 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에서 제작된 오가노이드를 이용한 다양한 용도를 제공하고자 한다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 혈관 조직을 포함하는 오가노이드(organoid)를 제조하는 방법과 이에 의해 제조된 오가노이드의 다양한 용도에 관한 것이다.

오가노이드의 제조 방법

[0010] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 후장 세포(hindgut cell)와 혈관 조직을 공배양(co-culture)하는 단계를 포함하는 오가노이드의 제조 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명에서 상기 후장 세포는, 줄기세포를 내배엽성 세포(endoderm cell)로 분화를 유도한 뒤 상기 내배엽성 세포로부터 후장 세포의 분화를 유도하여 얻어진 것일 수 있다.

[0012] 본 발명에서 상기 줄기세포(stem cell)는 배아 줄기세포(embryonic stem cells) 또는 성체 줄기세포일 수 있으나, 바람직하게는 인간 배아 줄기세포(hESC)일 수 있다.

[0013] 본 발명에서는 상기 줄기세포를 TGF- β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 내배엽성 세포로 분화를 유도할 수 있다.

- [0015] 본 발명에서 상기 TGF- β 패밀리 단백질로는 TGF- β , 액티빈(activin), 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 분화 인자(Growth and Differentiation Factor; GDF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 액티빈일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021, BIO((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime), BIO-아세톡심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime), 3F8(5-Ethyl-7,8-dimethoxy-H-pyrrolo[3,-4-c]isoquinoline-1,3(2H)-dione), A070722(1-(7-Methoxyquinoxalin-4-yl)-3-[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea), AR-A014418(N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N'-(5-nitro-2-thiazolyl)urea), SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione), SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), TC-G24(N-(3-Chloro-4-methylphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyl)phenyl]-5-benzofuranyl]-1,3,4-oxadiazole) 및 TWS119(3-[[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,-3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 CHIR99021일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명에서 상기 내배엽성 세포로의 분화 시 배양 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄스 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy' s 5A) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지에 소혈청(FBS), B27 보충제(supplement), N2 보충제 및 G5 보충제 중 적어도 하나를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명에서 상기 내배엽성 세포로의 분화 시 배양 기간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 12 시간 내지 7 일, 1 일 내지 6 일, 2 일 내지 4 일, 또는 3 일 내지 4 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서 상기 내배엽성 세포로의 분화 시 배지에 상기 줄기세포를 TGF- β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성화자의 존재 하에서 12 시간 내지 2 일 동안 배양한 뒤, B27 중 적어도 하나가 추가된 배지에서 TGF- β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성화자의 존재 하에서 12 시간 내지 2 일 동안 추가로 배양한 후, 소혈청이 추가된 배지에서 TGF- β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성화자의 존재 하에서 12 시간 내지 2 일 동안 추가로 배양하여 수행될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서는 상기와 같이 내배엽성 세포로의 분화가 유도되면, 섬유모세포 성장인자 4(fibroblast growth factor 4; FGF4) 및 Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 후장 세포로의 분화를 유도할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021, BIO((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime), BIO-아세톡심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime), 3F8(5-Ethyl-7,8-dimethoxy-H-pyrrolo[3,-4-c]isoquinoline-1,3(2H)-dione), A070722(1-(7-Methoxyquinoxalin-4-yl)-3-[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea), AR-A014418(N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N'-(5-nitro-2-thiazolyl)urea), SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione), SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), TC-G24(N-(3-Chloro-4-methylphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyl)phenyl]-5-benzofuranyl]-1,3,4-oxadiazole) 및 TWS119(3-[[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,-3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 CHIR99021일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에서 상기 후장 세포로의 분화 시 배양 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄스 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy' s 5A) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지에 소혈청(FBS)을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명에서 상기 후장 세포로의 분화 시 배양 기간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 1 일 내지 10 일, 1 일 내지 8 일, 1 일 내지 6 일, 2 일 내지 6 일, 또는 3 일 내지 5 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0024] 본 발명에서 상기 혈관 조직은, 줄기세포를 중배엽성 세포(mesoderm cell)로 분화를 유도한 뒤 상기 중배엽성 세포로부터 혈관계 세포(vascular lineage)로의 분화를 유도한 후 얻어진 혈관망 조직(vascular network)일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 줄기세포(stem cell)는 배아 줄기세포(embryonic stem cells) 또는 성체 줄기세포일 수 있으나, 바람직하게는 인간 배아 줄기세포(hESC)일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서는 상기 줄기세포를 중배엽성 세포로 분화를 유도하기에 앞서 필요에 따라서는 상기 줄기세포를 적어도 하나의 ROCK 억제제(Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase inhibitor)의 존재 하에서 배양하여 세포 집합체(cell aggregation)를 형성할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 ROCK 억제제는 Y-27632, H-1152, Y-30141, Wf-536, HA-1077, 하이드록실-HA-1077(hydroxyl-HA-1077), GSK269962A 및 SB-772077-B로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 상기 세포 집합체로의 배양 시 배양 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy' s 5A) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때 상기 배지에 닉아웃 혈청 대체(knock out serum replacement, KSR)를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 상기 세포 집합체로의 배양 시 5 부피% CO₂ 조건 하에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 상기 세포 집합체로의 배양 시 배양 기간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 3 시간 내지 7 일, 6 시간 내지 6 일, 12 시간 내지 5 일, 24 시간 내지 4 일, 또는 2 일 내지 4 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에서는 상기과 같이 세포 집합체가 형성되면, 적어도 하나의 Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator)의 존재 하에서 배양하여 중배엽성 세포로 분화를 유도할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021, BIO((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime), BIO-아세톡심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime), 3F8(5-Ethyl-7,8-dimethoxy-H-pyrrolo[3,4-c]isoquinoline-1,3(2H)-dione), A070722(1-(7-Methoxyquinoi in-4-yl)-3-[6-(tr-ifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea), AR-A014418(N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N'-(5-ni-tro-2-thiazolyl)urea), SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione), SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), TC-G24(N-(3-Chloro-4-methylphenyl)-5-(4-ni-trophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyl)ph-enyl]-5-benzofuranyi]-1,3,4-oxadiazole) 및 TWS119(3-[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,-3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 CHIR99021일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에서 상기 중배엽성 세포로의 분화 시 배양 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy' s 5A) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때 상기 배지에 닉아웃 혈청 대체(knock out serum replacement, KSR)를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 상기 중배엽성 세포로의 분화 시 배양은 5 부피% CO₂ 조건 하에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [0035] 또한, 본 발명에서 상기 중배엽성 세포로의 분화 시 배양 기간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 6 시간 내지 6 일, 12 시간 내지 4 일, 1 일 내지 3일, 또는 2 일 내지 3 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서는 상기과 같이 중배엽성 세포로의 분화가 유도되면, 골 형성 단백질(BMP), 성장 인자(growth factor) 및 TGF- β 억제제 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 혈관계 세포로의 분화를 유도할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질로는 BMP 패밀리 단백질에 속하는 한 구체적인 종류를 특별히 제한하지는 않

나, 예를 들어 BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9 및 BMP10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 BMP4를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 상기 성장 인자는 FGF-1, FGF-4, EGF, VEGF, VEGFA, VEGFB, PLGF, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 및 VEGF206로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 FGF-4 및 VEGFA 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명에서 상기 TGF- β 억제제는 SB43152 및 A-83-01 중 적어도 하나 일 수 있고, 바람직하게는 SB43152를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명에서 상기 혈관계 세포로의 분화 시 배양 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy' s 5A) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때 상기 배지에 닉아웃 혈청 대체(knock out serum replacement, KSR)를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 상기 혈관계 세포로의 분화 시 배양은 5 부피% CO₂ 조건 하에서 수행되는 것이 바람직하다.

[0042] 또한, 본 발명에서 상기 혈관계 세포로의 분화 시 배양 기간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 12 시간 내지 14 일, 1 일 내지 12 일, 4 일 내지 12 일, 또는 6 일 내지 10 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 바람직한 일 예시로 상기 혈관계 세포로의 분화 시 중배엽성 세포를 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 인자(growth factor) 중 적어도 하나, 바람직하게는 골 형성 단백질(BMP); 및 FGF-4, EGF 및 VEGFA 중 적어도 하나;의 존재 하에서 3 일 내지 10 일, 바람직하게는 4 일 내지 8 일 동안 1차로 배양한 뒤, 성장 인자(growth factor) 및 TGF- β 억제제 중 적어도 하나, 바람직하게는 FGF-4, EGF 및 VEGFA 중 적어도 하나; 및 TGF- β 억제제의 존재 하에서 12 시간 내지 4 일, 바람직하게는 1 일 내지 3 일 동안 2차로 배양하며 수행되는 것이, 혈관 내피 세포(endothelial cells)로의 분화 효율을 높이고 혈관 주위 세포(pericyte)로의 분화는 억제할 수 있다.

[0044] 본 발명에서는 상기와 같이 혈관계 세포로의 분화가 유도되면, 적어도 하나의 성장 인자(growth factor)의 존재 하에서 3차원 배양하여 혈관망 조직 형성을 유도할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 성장 인자는 FGF-1, FGF-4, EGF, VEGF, VEGFA, VEGFB, PLGF, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 및 VEGF206로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 FGF-4 및 VEGFA 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에서 상기 혈관망 조직 형성 시 3차원 배양은 폴리에스테르, 폴리알킬렌, 폴리플루오로클로로에틸렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리스티렌, 폴리설폰, 셀룰로오스 아세테이트, 글래스 파이버, 세라믹 입자, 매트릭젤(matrigel), 세포외 기질 성분(예, 피브로넥틴(fibronectin), 콘드로넥틴(chondronectin), 라미닌(laminin)), 콜라겐, 폴리 L 유산 및 불활성 금속 파이버로 구성된 그룹으로부터 선택되는 접착 물질을 사용하여 수행될 수 있고, 바람직하게는 매트릭젤과 콜라겐 I의 혼합 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에서 상기 혈관망 조직 형성 시 배양 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy' s 5A) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지에 소혈청(FBS) 또는 닉아웃 혈청 대체(knock out serum replacement, KSR)를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명에서 상기 혈관망 조직의 형성 시 3차원 배양 기간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 12 시간 내지 14 일, 2 일 내지 12 일, 4 일 내지 12 일, 또는 5 일 내지 8 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명에서 상기와 같이 후장 세포 및 혈관망 조직으로의 분화가 유도되면, 상기 후장 세포와 상기 혈관망 조

직을 공배양(co-culture)하여 오가노이드, 특히는 장관 오가노이드로의 분화를 유도할 수 있다.

- [0050] 본 발명에서 상기 공배양은 Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator), 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 인자(growth factor) 중 적어도 하나의 존재 하에서 수행될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021, BIO((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime), BIO-아세톡심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime), 3F8(5-Ethyl-7,8-dimethoxy-H-pyrrolo[3,4-c]isoquinoline-1,3(2H)-dione), A070722(1-(7-Methoxyquinoiin-4-yl)-3-[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea), AR-A014418(N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N'-(5-nitro-2-thiazolyl)urea), SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione), SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), TC-G24(N-(3-Chloro-4-methylphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyl)phenyl]-5-benzofuranyl]-1,3,4-oxadiazole) 및 TWS119(3-[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 CHIR99021일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질로는 BMP 패밀리에 속하는 한 구체적인 종류를 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들어 BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9 및 BMP10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 BMP4를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에서 상기 성장 인자는 FGF-1, FGF-4, EGF, VEGF, VEGFA, VEGFB, PLGF, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 및 VEGF206로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 FGF-4, EGF 및 VEGFA 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서 상기 공배양은 3차원 배양 방법에 의해 수행될 수 있다. 여기서 상기 3차원 배양을 위한 구체적인 조건은 특별히 제한하지 않으며 당해 기술분야에서 일반적으로 수행되는 방법에 의할 수 있으나, 예를 들면, 폴리에스테르, 폴리알킬렌, 폴리플루오로클로로에틸렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리스티렌, 폴리설폰, 셀룰로오스 아세테이트, 글래스 파이버, 세라믹 입자, 매트릭젤(matrigel), 세포외 기질 성분(예, 피브로넥틴(fibronectin), 콘드로넥틴(chondronectin), 라미닌(laminin)), 콜라겐, 폴리 L 유산 및 불활성 금속 파이버로 구성된 그룹으로부터 선택되는 접착 물질을 사용하여 수행될 수 있고, 바람직하게는 매트릭젤, 또는 매트릭젤과 콜라겐 I의 혼합 배지를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 상기 장관 오가노이드로의 분화 시 배양 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), a-MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12), RPMI 1640, 윌리엄스 배지 E(Williams' s medium E), 맥코이 5A(McCoy' s 5A) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때 상기 배지에 녹아있는 혈청 대체(knock out serum replacement, KSR)를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 상기 장관 오가노이드로의 분화 시 배양 기간은 2 일 내지 30 일, 6 일 내지 24 일, 8 일 내지 16 일, 또는 10 일 내지 14 일 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [0057] 본 발명에서는 상기와 같이 장관 오가노이드로의 분화가 유도되면, 상기 장관 오가노이드를 계대 배양하여, 상기 장관 오가노이드의 성숙을 유도할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 상기 계대 배양은 Wnt 신호 활성화자(Wnt signaling activator), 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 인자(growth factor) 중 적어도 하나의 존재 하에서 수행될 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성화자는 CHIR99021, BIO((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-oxime), BIO-아세톡심((2'Z,3'E)-6-Bromoindirubin-3'-acetoxime), 3F8(5-Ethyl-7,8-dimethoxy-H-pyrrolo[3,4-c]isoquinoline-1,3(2H)-dione), A070722(1-(7-Methoxyquinoiin-4-yl)-3-[6-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]urea), AR-A014418(N-[(4-Methoxyphenyl)methyl]-N'-(5-nitro-2-thiazolyl)urea), SB216763(3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione), SB415286(3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione), TC-G24(N-(3-Chloro-4-methylphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyl)phenyl]-5-benzofuranyl]-1,3,4-oxadiazole) 및 TWS119(3-[6-(3-Aminophenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxyphenol ditrifluoroacetate)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 CHIR99021일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0060] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질로는 BMP 패밀리에 속하는 한 구체적인 종류를 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들어 BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8, BMP9 및 BMP10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 BMP4를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명에서 상기 성장 인자는 FGF-1, FGF-4, EGF, VEGF, VEGFA, VEGFB, PLGF, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 및 VEGF206로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 FGF-4, EGF 및 VEGFA 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에서 상기 계대 배양은 3차원 배양 방법에 의해 수행될 수 있다. 여기서 상기 3차원 배양을 위한 구체적인 조건은 특별히 제한하지 않으며 당해 기술분야에서 일반적으로 수행되는 방법에 의할 수 있으나, 예를 들면, 폴리에스테르, 폴리알킬렌, 폴리플루오로클로로에틸렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리스티렌, 폴리설폰, 셀룰로오스 아세테이트, 글래스 파이버, 세라믹 입자, 매트릭젤(matrigel), 세포외 기질 성분(예, 피브로넥틴(fibronectin), 콘드로넥틴(chondronectin), 라미닌(laminin)), 콜라겐, 폴리 L 유산 및 불활성 금속 파이버로 구성된 그룹으로부터 선택되는 접착 물질을 사용하여 수행될 수 있고, 바람직하게는 매트릭젤을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 상기 장관 오가노이드의 성숙 유도 시 계대 배양을 위한 배지는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), a-MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배양 배지를 사용하여 수행될 수 있고, 여기에 녹아웃 혈청 대체(knock out serum replacement, KSR)를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 상기 장관 오가노이드의 성숙 유도 시 계대 배양 기간은 2 일 내지 14 일, 4 일 내지 12 일, 6 일 내지 10 일, 또는 7 일 내지 9 일 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [0065] 본 발명에서는 상기와 같이 혈관 조직을 포함하는 장관 오가노이드를 제작함으로써 성체(adult)가 가지는 체내 실제 장관과 영양분 및 약물 흡수 기능, 점액 분비, 호르몬 분비 등 실제 기능성을 모사할 수 있는 체내 실제 장관과의 유사도가 높은 장관 오가노이드를 제공할 수 있다.
- [0067] **오가노이드**
- [0068] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 방법으로 제조된 오가노이드를 제공한다. 여기서, 상기 오가노이드는 장관 오가노이드일 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 제공하는 장관 오가노이드는 혈관 조직을 포함하여 인간의 체내 장관에 매우 유사한 기능 및 형태를 가지고 있어 전 세계적인 동물실험 대체 모델에 대한 요구에 있어서 장관 관련 질환 모델에 대안으로 사용될 수 있다.
- [0071] **조직 치료제**
- [0072] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 오가노이드를 포함하는 조직 치료제에 관한 것이다. 여기서, 상기 오가노이드는 장관 오가노이드일 수 있다.
- [0073] 본 발명에서 상기 조직은 장관 조직을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] **장 관련 질환의 치료 방법**
- [0076] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 장관 오가노이드를 목적하는 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 장관 관련 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0077] 본 발명에서 상기 목적하는 개체란, 장관 관련 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간과, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그 등을 포함한 모든 동물을 의미하는 것으로, 본 발명의 오가노이드, 장관 오가노이드를 개체에게 투여함으로써 장관 관련 질환을 효과적으로 치료할 수 있다면 개체의 종류는 제한없이 포함된다.
- [0078] 본 발명에서 상기 장관 관련 질환은 염증성 장관 질환(IBD), 과민성 대장 증후군(IRS), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(UC), 단장 증후군(short bowel syndrome), 장염(enterocolitis), 유전적 장질환인 히르슈슈프룽 병(hirschsprung's disease), 셀리악 병(Celiac disease) 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] **장 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법**

- [0081] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 오가노이드를 이용하여 장 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0082] 본 발명에서는 상기 오가노이드에 피검 물질을 처리하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 상기 피검 물질은 장 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 것으로 예측되는 물질로, 예를 들면, 약물 후보 물질, 피검 화합물 또는 피검 조성물은 저분자 화합물, 항체, 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA), 핵산, 단백질, 펩티드, 기타 추출물 또는 천연물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명에서는 상기 피검 물질의 처리 후 장 관련 질환의 바이오마커 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA의 발현이 처리 전과 비교하여 증가 또는 감소되는 경우, 상기 피검 물질을 장 관련 질환의 치료제로 선별하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0085] 본 발명에서 상기 장 관련 질환은 염증성 장 질환(IBD), 과민성 대장 증후군(IBS), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(UC), 단장 증후군(short bowel syndrome), 장염 (enterocolitis), 유전적 장질환인 히르슈슈프룽 병 (hirschsprung's disease), 셀리악 병(Celiac disease) 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0086] 본 발명에서는 혈관 조직을 포함하는 오가노이드, 특히는 장관 오가노이드를 용이하고 효율적으로 제조하는 방법을 제공하며, 이에 따라 제조된 혈관 조직을 포함하는 장관 오가노이드는 성체(adult)가 가지는 체내 실제 장관과 영양분 및 약물 흡수 기능, 점액 분비, 호르몬 분비 등 실제 기능성이 매우 유사하여, 조직 치료제나 장관 관련 질환의 치료를 위한 약물 스크리닝의 용도 등의 다양한 용도에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0087] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간 배아 줄기세포로부터 혈관망 조직으로의 분화를 유도하는 실험 설계도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 준비예 3에서 유도된 중배엽성 세포에 대하여 미분화 줄기세포의 마커인 OCT4와, 중배엽성 세포의 마커인 EOMES, MIXL1 및 BRACHY의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 준비예 3에서 인간 배아 줄기세포로부터 혈관망 조직으로의 분화를 유도하는 실험의 개시 후 4일, 7일 및 10일 쯤에 현미경 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 1에서 유도된 장관 오가노이드에서 대장 특이적 마커인 SATB2 mRNA 발현 수준과, 혈관 내피 세포의 마커인 CD34 및 혈관 수축 세포의 마커인 PDGFR β 의 발현 수준을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예 1에서 후장 세포와 혈관망 조직의 공배양 개시 후 20일 쯤에 현미경 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예 1에서 장관 오가노이드의 성숙 후 CD31, CD34 및 PDGFR β 에 대하여 면역 형광 염색을 수행한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 비교예에서 후장 세포와 혈관망 조직의 공배양 후 성숙시킨 뒤 현미경 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0088] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0090] **실시예**
- [0092] [준비예 1] 세포주의 준비 및 유지
- [0093] 이하의 실험에서는 인간 배아 줄기세포를 사용하였고, 배지는 Stemfit 배지로 이들에 한번씩 교체해 주었다. 단, 상기 Stemfit 배지로는 b-FGF(20ng/ml)를 포함하는 것을 사용하였다. 세포는 5% CO₂ 및 37℃의 온도 조건 하에서 배양하였고, 세포를 7일 이내로 계대 배양하였다.

[0095] [준비에 2] 후장 세포로의 분화 유도

[0096] 1. 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화 유도

[0097] 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위해 액티빈 A(100ng/ml) 및 CHIR99021(3um)를 첨가한 RPMI1640 배지에 배아줄기세포를 200,000 세포수로 접종한 뒤 배양하며 내배엽성 세포로의 분화를 유도하였다. 분화 기간은 총 3일로, 2일 째에 상기 배지에 FBS를 0.2중량% 첨가하고, 3일 째에 상기 배지에 FBS를 2중량%의 양으로 첨가하였으며, 1일 째에 보충제로 B27 보충제를 첨가하였다.

[0098] 2. 내배엽성 세포로부터 후장(hind gut) 세포의 분화 유도

[0099] 상기 내배엽성 세포로부터 후장 세포의 분화를 유도하기 위하여 FBS 2 중량%, FGF4(500ug/ml) 및 CHIR99021(3uM)를 첨가한 DMEM F-12 배지에 상기 내배엽성 세포를 접종한 뒤 4일 동안 분화를 유도하였다. 분화 유도 기간이 도과하자 스페로이드(spheroids) 형상의 후장 세포가 얻어졌고, 웰당 30개의 스페로이드가 형성되었다.

[0101] [준비에 3] 혈관망 조직으로의 분화 유도

[0102] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 인간 배아 줄기세포로부터 혈관망 조직으로의 분화를 유도하는 실험 설계도를 나타낸 것으로, 이하의 실험에서는 도 1에 나타낸 조건으로 수행하였다.

[0103] 1. 중배엽성 세포로의 분화 유도

[0104] 인간 배아 줄기세포로부터 중배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위하여, 상기 인간 배아 줄기세포를 12 μ M CHIR99021 (Tocris)가 첨가된 DMEM F/12 (KSR20%) 배지에 접종하여 5부피% CO₂ 조건 하에서 2 일간 배양하였다. 배양 후 얻어진 세포에 대하여, 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 미분화 줄기세포의 마커인 OCT4와, 중배엽성 세포의 마커인 EOMES, MIXL1 및 BRACHY의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 상기 세포에서 미분화 줄기세포의 마커인 OCT4 mRNA 발현 수준은 감소하고, 중배엽성 세포의 마커인 EOMES, MIXL1 및 BRACHY의 mRNA 발현 수준은 증가하였는 바, 중배엽성 세포로의 분화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.

표 1

유전자	정방향	역방향
OCT4	5'-GGGGTTCTATTGTTGGAAGGTAT-3'	5'-TGTTGTCAGCTTCCTCCACC-3'
EOMES	5'-ATCATTACGAAACAGGCAGGC-3'	5'-CGGGTTGGTATTGTGTAAAG-3'
MIXL1	5'-ACGTCTTTCAGCGCCGAACAG-3'	5'-TTGGTTCGGGCAGGCAGTTCA-3'
BRACHY	5'-GTGCTGTCCAGGTGGCTTACAGATG-3'	5'-CCTTAACAGCTCAACTCTAACTACTTG-3'

[0107] 2. 혈관계 세포로의 분화 유도

[0108] 상기 중배엽성 세포로부터 혈관계 세포로의 분화를 유도하기 위하여, 상기 중배엽성 세포로의 분화 배지에 BMP4 30 ng/ml, VEGFA 30 ng/ml 및 FGF-4 30 ng/ml를 처리한 뒤 5부피% CO₂ 조건 하에서 6 일간 배양하였다. 배양 7 일 째에 배양 배지를 VEGFA 30 ng/ml, FGF-4 30 ng/ml 및 SB43152 10 μ M를 포함하는 DMEM:F12 배지로 교체해 주고 5부피% CO₂ 조건 하에서 2 일간 배양하였다.

[0109] 3. 혈관망 조직의 형성

[0110] 상기 혈관계 세포로부터 혈관망 조직을 형성하기 위하여, 혈관계 세포 집합체를 매트릭젤과 콜라겐 I이 1:1의 부피로 혼합된 겔에 끼워 넣은 뒤 15% FBS (Gibco), 100 ng/ml VEGFA 및 100 ng/ml FGF-4를 포함하는 DMEM:F12 배지를 덮고 6 일간 배양하였고, 배양 시 2 내지 3 일 마다 신선한 배지로 교체해 주었다.

[0111] 인간 배아 줄기세포로부터 혈관망 조직으로의 분화를 유도하는 실험의 개시일로부터 4일, 7일 및 10일째에 현미경 사진을 촬영하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이, 4일째에는 중배엽성 세포로 분화가 완료된 것을 볼 수 있고, 7일째에는 혈관계 세포로 분화가 유도되는 것을 확인할 수 있으며, 10일째에는 혈관망 조직이 형성된 것을 볼 수 있다.

[0113] [실시예 1] 혈관 조직을 포함하는 장관 오가노이드의 제작

[0114] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 후장 세포와 혈관망 조직의 공배양을 통해 장관 오가노이드로의 분화를 유

도하는 실험 설계도를 나타낸 것으로, 이하의 실험에서는 도 1에 나타낸 조건으로 수행하였다.

1. 후장 세포와 혈관망 조직의 공배양을 통한 장관 오가노이드의 분화 유도

상기 준비예 2에서 얻어진 후장 세포와 상기 준비예 3에서 얻어진 혈관망 조직을 BMP4 30 ng/ml, 12 μ M CHIR99021, EGF 100 ng/ml, VEGFA 30 ng/ml 및 FGF-4 30 ng/ml가 첨가된 DMEM F/12 (KSR20%)에서 12 일 동안 3차원 공배양 하여 혈관 조직을 포함하는 장관 오가노이드의 분화를 유도하였다.

2. 장관 오가노이드의 성숙

상기와 같이 분화 유도된 장관 오가노이드를 마트리젤(Matrigel)을 이용하여 BMP4 30 ng/ml, 12 μ M CHIR99021, EGF 100 ng/ml, VEGFA 30 ng/ml 및 FGF-4 30 ng/ml가 첨가된 DMEM F/12 (KSR20%)에서 5 일간 계대 배양하여 성숙시켰다.

이후, 하기 표 2의 프라이머를 사용하여 대장 특이적 마커인 SATB2의 mRNA 발현 수준을 측정하였고, 항-CD34 항체(Santa cruz) 및 항-PDGFR β 항체(Santa cruz)를 이용하여 혈관 내피 세포의 마커인 CD34 및 혈관 수축 세포의 마커인 PDGFR- β 의 발현 수준을 측정하였다. 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 상기 장관 오가노이드에서 대장 특이적 마커인 SATB2 mRNA 발현 수준이 증가하였고, 그 외에 혈관 내피 세포의 마커인 CD34 및 혈관 수축 세포의 마커인 PDGFR β 의 발현 수준 또한 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

또한, 후장 세포와 혈관망 조직의 공배양 개시 후 20일 째에 현미경 사진을 촬영하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 그 결과, 공배양 개시 후 20일 째에 오가노이드가 형성된 것을 확인할 수 있었다.

또한, 장관 오가노이드의 성숙 후 항-CD31 항체(Santa cruz), 항-CD34 항체(Santa cruz) 및 항-PDGFR β 항체(Santa cruz)로 블러킹(blocking)하며 4℃에서 밤새 배양한 뒤 2차 항체를 추가하여 역시 4℃에서 밤새 배양하여 면역 형광 염색을 수행하였다. 이후 현미경으로 촬영한 사진을 도 6에 나타내었다. 그 결과, 상기 장관 오가노이드에서 혈관 내피 세포 마커인 CD-31과, 혈관 수축 세포의 마커인 PDGFR- β 가 발현되는 것을 확인할 수 있는 바, 완전한 혈관으로서 분화가 된 것을 알 수 있었다.

[비교예]

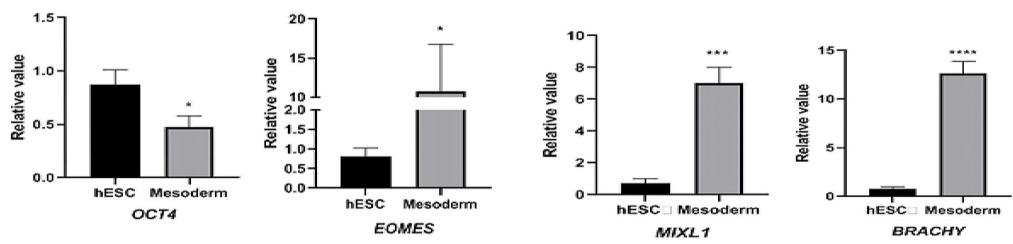
준비예 3에서 인간 배아 줄기세포로부터 혈관망 조직으로의 분화 유도 시 5 부피% CO₂ 분위기가 아닌 5 부피% O₂ 분위기 조건으로 수행한 뒤, 얻어진 혈관망 조직을 사용하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 후장 세포와 공배양한 뒤 성숙시켰다. 하지만, 도 7의 현미경 사진에서 보는 바와 같이, 혈관망 조직으로 분화 시 5 부피% O₂ 분위기 조건으로 수행하는 경우 후장 세포와 공배양 하여도 장관 오가노이드가 제작되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

도면

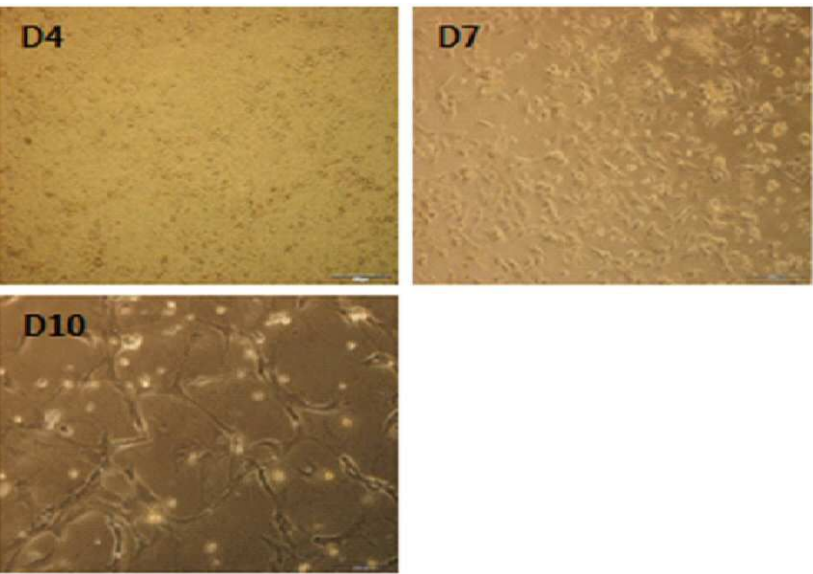
도면1

Day	D1	D5	D6	D7	D9	D11	D13	D15	D17
Factors	CHIR-99021		BMP4 VEGF-A FGF4		EGF VEGF-A FGF4		EGF VEGF-A FGF4		3D Co-culture (Hind gut)
Stage	Monoculture		Vascular Stage Promotion				Vascular Networks		
DMEM F/12 Media + Knock out Serum Replacement 20%									
Day	D17	D19	D21	D23	D27	D29	D31	D33	D ...
Factors			BMP4 EGF CHIR-99021 VEGF-A FGF4				BMP4 EGF CHIR-99021 VEGF-A FGF4		
Stage			Contact of the colon with Vascular				Subculture and Long-term culture		
DMEM F/12 Media + Knock out Serum Replacement 20%									

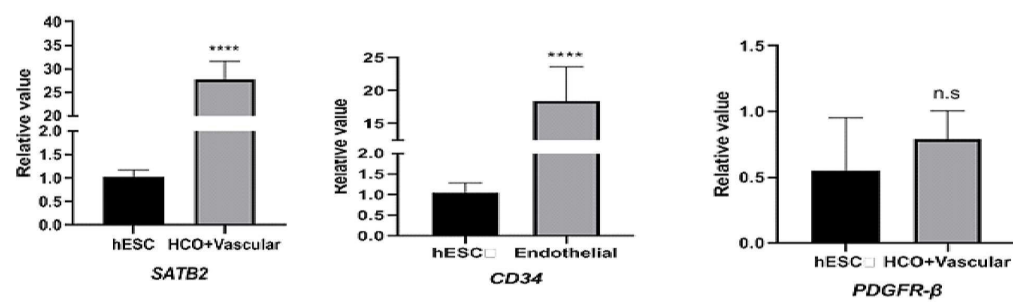
도면2



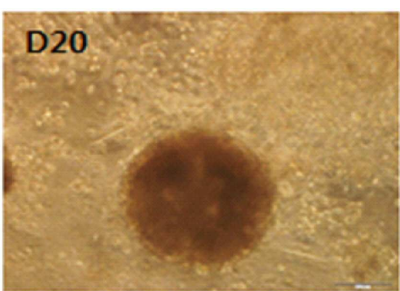
도면3



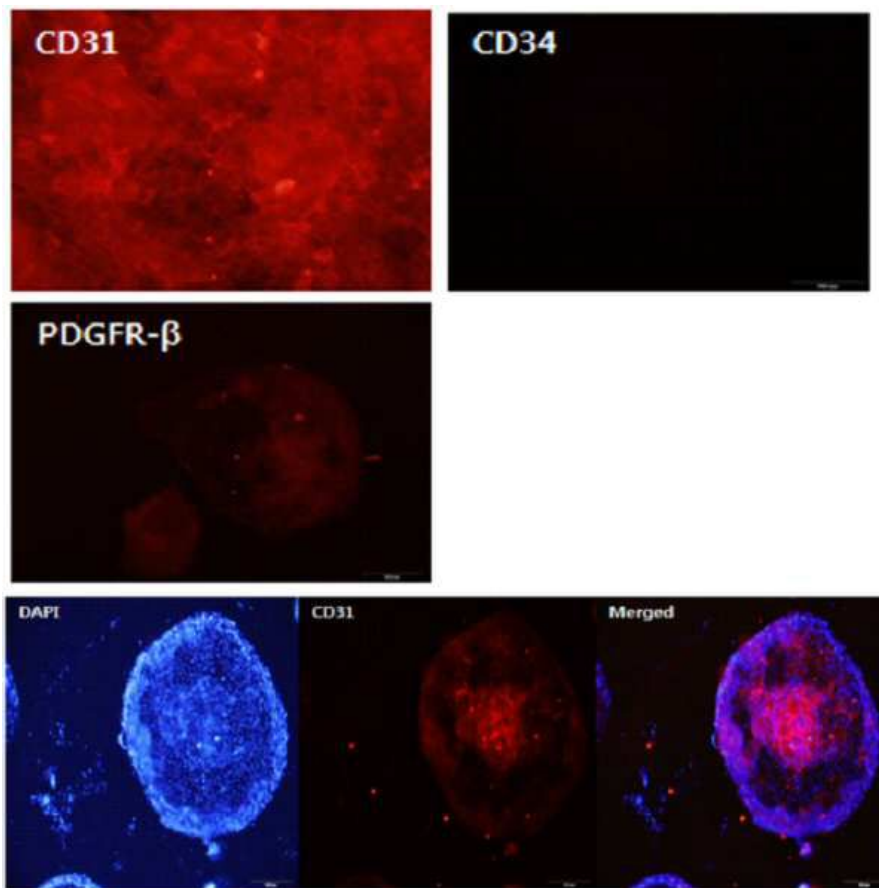
도면4



도면5



도면6



도면7

