



등록특허 10-2334245



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월03일

(11) 등록번호 10-2334245

(24) 등록일자 2021년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0793 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/062 (2013.01)

C12N 2501/01 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0064908

(22) 출원일자 2020년05월29일

심사청구일자 2020년05월29일

(65) 공개번호 10-2020-0138067

(43) 공개일자 2020년12월09일

(30) 우선권주장

1020190062988 2019년05월29일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140037210 A*

KR1020160006167 A

KR1020170008723 A

US20170191030 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김철훈

경기도 성남시 분당구 내정로 151-1(수내동, 양지마을금호3단지한양5단지아파트)

권순성

서울특별시 종로구 통일로16길 8-3, 117동 201호 (무악동, 인왕산아이파크)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 12 항

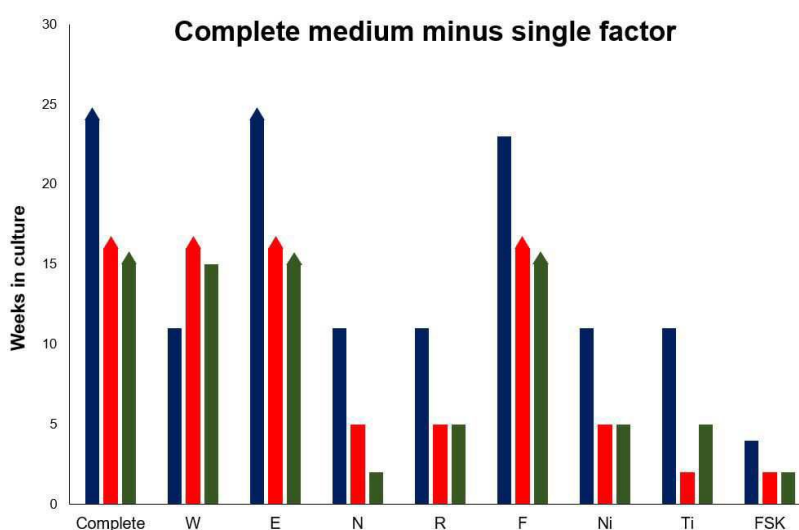
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 인간 미뢰 오가노이드의 배양용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인간 미뢰(taste bud) 오가노이드 배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 인간 미뢰 오가노이드의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 다각적인 실험을 통해 섬세한 감각기관인 인간 미뢰 특이적 필수 배양성분을 선별함으로써, 아직까지 제안된 적 없는 인간 미뢰 오가노이드를 위한 최적의 배양 환경을 제공한다. 이에, 본 발명은 인간 미뢰의 유전자 발현 프로파일과 미각원에 대한 반응 등 생체 내 주요 기능 및 표현형이 완전히 재연되는 효율적인 오가노이드 제작에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/119 (2013.01)
C12N 2501/15 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)

문석준

서울특별시 서대문구 연희로15안길 6-4(연희동)

(72) 발명자

조형주

서울특별시 서초구 잠원로8길 35, 103동 1802호(잠원동, 래미안 신반포 팰리스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2019R1A2C3002354
과제번호	NRF-2019R1A2C3002354
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	PCDH19 돌연변이에 의한 뇌질환 프로세스 규명
기 여 율	40/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108917
과제번호	2018R1A5A2025079
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업 선도연구센터지원사업
연구과제명	만성난치질환 시스템의학 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105871
과제번호	2016R1A5A2008630
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초의학분야(MRC)
연구과제명	미각연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Wnt3a 조건화 배지, R-스폰딘-1 조건화 배지, 노긴(Noggin), A83-01, 포스콜린(Forskolin), EGF, FGF10, IL-4(interleukin-4) 및 SAG(Smoothened agonist)를 유효성분으로 포함하는 인간 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 분화 유도용 배지 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 줄기세포 배양용 기본 배지(basal media) 조성물을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 줄기세포 배양용 기본 배지는 Advanced DMEM/F12 배지인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 Advanced DMEM/F12 배지는 양쪽이온성 완충액, 알라닐글루타민(alanylglutamine), B-27, N2 및 N-아세틸시스테인으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분이 보충된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 양쪽이온성 완충액은 HEPES, MOPs 및 탄산 완충액(bicarbonate buffer)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 완충액인 것을 특징으로 하는 조성물.

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

Wnt3a 조건화 배지, R-스폰딘-1 조건화 배지, 노킨(Noggin), A83-01, 포스콜린(Forskolin), EGF, FGF10 및 니코틴아마이드를 유효성분으로 포함하는 인간 미뢰 오가노이드(taste bud organoid)의 성장 또는 확장용 배지 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

혀 조직로부터 분리된 성체 줄기세포를 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 배양하는 단계를 포함하는 인간 미뢰(taste bud) 오가노이드의 제조 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서, 상기 혀 조직은 성곽유두(circumvallate papillae)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 23 항에 있어서, 상기 방법은 배양 개시 후 2일 내지 5일 동안 ROCK 억제제를 배지에 첨가하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 ROCK 억제제는 Y-27632인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 23 항에 있어서, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 허 조직로부터 분리된 성체 줄기세포를 제 17 항의 배지 조성물에서 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)의 결과물을 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 배양하는 단계.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 배양 개시 후 5일 내지 12일 후 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원 기관형 배양체, 구체적으로는 인간 미뢰 오가노이드의 배양을 위한 배지 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 줄기세포는 특유의 다분화능(multi-potency)과 자가 재생(self-renewal) 능력을 가져 조직의 비가역적 소실을 원인으로 하는 다양한 퇴행성 질환에 대한 재생 치료에 적용되는데, 최근 줄기세포를 적절한 조건의 3차원 환경에서 배양할 경우 생체 내 기관과 유사한 구조가 형성된다는 사실이 밝혀져 이를 유사장기, 또는 오가노이드(organoid)라 명명하게 되었다. 이러한 오가노이드를 이용하여 생체 내와 유사한 3차원 환경을 재현함으로써 *비트로* 실험 상황에서도 시험물질이 마치 *인 비보*에서 작용하듯 실험할 수 있을 뿐더러 실제 대상체, 예를 들어 사람의 장기에서 나타나는 작용과 효과를 생체 외에서 그대로 재현할 수 있어, 질환 모델링, 병리연구, 약물 스크리닝, 독성평가, 유전자 조작 등에 유용하게 활용될 수 있다.

[0004] 이론적으로 모든 종류의 유사 장기를 줄기세포만으로 제작할 수 있기 때문에, 오가노이드는 다양한 질병에 대한 연구에 이용 가능하다. 그러나, 오가노이드의 배양 및 유지 기술은 아직 초기 연구단계로 완전히 확립되지 못했으며, 구체적인 배양액의 성분이나 효과적인 배양 방법에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 특허출원 제11/352,924호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 재연하고자 하는 기관의 성격에 따라 상이한 배양 성분이 적용되어야 하는 3차원 기관형 배양체(organotypic culture)의 배양에 있어서, 아직까지 제안된 적 없는 인간 미뢰(human taste bud) 오가노이드 수득을 위한 최적의 배양 환경을 구축하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 전구세포 또는 다분화능 세포를 위한 기본배지(basal media)에 Wnt 아고니스트, 골형성 단백질(BMP) 억제제, TGF- β 억제제 및 cAMP 경로 활성화제를 포함하는 유효성분이 보충될 경우 이를 배양성분으로 하여 인간 미뢰의 생체 내 기능과 표현형이 높은 수준으로 재연되는 효율적인 오가노이드를 수득할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 인간 미뢰 오가노이드 배양용 배지 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 배지 조성물을 이용한 인간 미뢰 오가노이드의 제조 방법을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 Wnt 아고니스트, 골형성 단백질(BMP) 억제제, TGF- β 억제제 및 cAMP 경로 활성화제를 유효성분으로 포함하는 인간 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 재연하고자 하는 기관의 성격에 따라 상이한 배양 성분이 적용되어야 하는 3차원 기관형 배양체(organotypic culture)의 배양에 있어서, 아직까지 제안된 적 없는 인간 미뢰(human taste bud) 오가노이드 수득을 위한 최적의 배양 환경을 구축하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 전구세포 또는 다분화능 세포를 위한 기본배지(basal media)에 Wnt 아고니스트, 골형성 단백질(BMP) 억제제, TGF- β 억제제 및 cAMP 경로 활성화제를 포함하는 유효성분이 보충될 경우 이를 배양성분으로 하여 인간 미뢰의 생체 내 기능과 표현형이 높은 수준으로 재연되는 효율적인 오가노이드를 수득할 수 있음을 발견하였다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 “오가노이드(organoid)”는 1차 조직(primary tissue), 조직 하위단위 또는 단일세포(예를 들어 줄기세포)로 구성된 생체 외 3차원 세포 집합체(3D cellular cluster)를 의미한다. 오가노이드는 자가재생(self-renewal)과 자가조직화(self-organization)가 가능하며 본래 조직과 유사한 표현형 및 기능을 재연하므로, “소형 유사 장기” 또는 “장기 유사체”로도 명명될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 조성물로 배양할 수 있는 오가노이드는 예를 들면, 전분화능 줄기세포로부터 유래한 오가노이드 또는 성체 줄기세포로부터 유래한 오가노이드일 수 있으며, 상기 전분화능성 줄기세포는 배아줄기세포(ESC) 또는 유도만능줄기세포(iPSC)일 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 상기 오가노이드는 성체 줄기세포로부터 유래한 오가노이드이며, 보다 구체적으로는 인간 미뢰(human taste bud)에서 분리된 성체 줄기세포로부터 유래한 오가노이드이다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “줄기세포(stem cell)”는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 미분화 세포들을 지칭한다. 용어 “성체 줄기세포”는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 “배양”은 생체로부터 분리된 세포, 이들의 2차원 또는 3차원적 집합체, 조직 또는 조직의 일부를 체외에서 증식, 성장, 유지 및 분화시키는 것을 의미한다. 이에, 용어 “배양”은 출발 물질(세포, 조직 또는 조직 유사체)을 이용하여 인공적인 환경 하에서 목적 물질을 수득하는 전 과정을 포괄하는 의미이며, 이에 “배양용 조성물”은 “증식용 조성물”, “성장용 조성물”, “유지용 조성물” 및 “분화 유도용 조성물”을 모두 포함하는 의미이다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 배지 조성물은 줄기세포 배양용 기본 배지(basal media) 조성물을 추가적으로 포함한다. 이러한 기본 배지로는 당업계에서 줄기세포 배양에 이용되는 다양한 배지가 사용될 수 있으며, 예를 들어 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(Alpha Modification of Eagle's Medium), F12(Nutrient Mixture F-12) 및 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 줄기세포 배양용 기본 배지는 Advanced DMEM/F12 배지일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 배양 조성물은 상술한 인간 미뢰 오가노이드 배양에 특이적인 조성물에 줄기세포 배양용 기본 배지(basal media) 조성물이 조합된 조성물이다. 따라서, “줄기세포 배양용 기본 배

지 조성물을 추가적으로 포함한다”는 의미는 줄기세포 배양용 기본 배지에 상술한 오가노이드 배양에 특이적인 조성물이 보충되거나(supplemented) 첨가되었다(added)는 의미와 동일한 의미이다.

- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Advanced DMEM/F12 배지는 양쪽이온성 완충액, 알라닐글루타민(alanylglutamine), B-27, N2 및 N-아세틸시스테인으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분이 보충된다. 보다 더 구체적으로는 상기 양쪽이온성 완충액은 HEPES, MOPs 및 탄산 완충액(bicarbonate buffer)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 완충액이며, 가장 구체적으로는 HEPES이다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “Wnt 아고니스트”는 세포에서 TCF/LEF-매개된 전사를 활성화하는 물질로서, Wnt 패밀리의 단백질 중 어느 하나와 결합하여 이를 활성화하거나, 세포 내 β -카테닌 분해를 억제하거나, TCF/LEF를 활성화하는 물질을 포괄하는 의미이다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 Wnt 아고니스트는 Wnt3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-7b, R-스폰딘(spondin)-1, R-스폰딘-2, R-스폰딘-3, R-스폰딘-4 및 노린(Norrin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아고니스트이다. 보다 구체적으로는 Wnt3a, R-스폰딘-1 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되며, 가장 구체적으로는 Wnt3a 및 R-스폰딘-1의 조합이다.
- [0026] 본 발명에서 Wnt 아고니스트로서 Wnt3a 및/또는 R-스폰딘-1이 사용될 경우, Wnt3a-조건화된 배지(conditioned media, CM) 및 R-스폰딘-1-조건화된 배지의 형태로 각각 기본 배양 배지에 첨가될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “골형성 단백질(BMP) 억제제”는 BMP 분자 또는 BMP 수용체와 경쟁적으로 결합하여 BMP와 BMP 수용체 간의 복합체 형성을 억제함으로써 BMP의 활성을 중화 또는 저해하는 물질을 의미한다. 본 발명에서 이용되는 BMP 억제제는 BMP 분자 또는 이의 수용체와 결합을 형성하는 것으로 당업계에 알려진 다양한 천연 또는 합성 분자를 포함하며, 예를 들어 노긴(Noggin), CER1 및 그렐린(Gremlin)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 BMP 억제제는 노긴이다.
- [0028] 본 발명에서 BMP 억제제로서 노긴이 사용될 경우, 기본 배양 배지에 30 - 120 ng/ml, 보다 구체적으로는 50 - 120 ng/ml, 보다 더 구체적으로는 70 - 120 ng/ml, 가장 구체적으로는 90 - 110 ng/ml로 첨가될 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “TGF- β 억제제”는 TGF- β 신호경로를 직접 또는 간접적으로 억제하거나 저해하는 다양한 천연 또는 합성 분자를 의미하며, 예를 들어 A83-01, SB-431542, SB-505124, SB-525334, SD-208, LY-36494, SJN-2511 및 LY2157299 (갈루니서티브, galunisertib)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 TGF- β 억제제는 A83-01, SB-505124 및 갈루니서티브(galunisertib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제이며, 보다 구체적으로는 A83-01이다.
- [0031] 본 발명에서 TGF- β 억제제로서 A83-01이 사용될 경우, 기본 배양 배지에 2-8 μ M, 보다 구체적으로는 3-7 μ M, 가장 구체적으로는 4-6 μ M로 첨가될 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “cAMP 경로 활성화제”는 cAMP의 생성을 증가시키거나 아데닐릴 사이클라제(adenylyl cyclase)의 활성 또는 발현량을 증가시킴으로써 cAMP 경로를 직접 또는 간접적으로 촉진시키는 다양한 천연 또는 합성 분자를 의미한다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 cAMP 경로 활성화제는 포스콜린(Forskolin), 8-브로모-cAMP, 콜레라 독소 및 NKH 477로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성화제이며, 보다 구체적으로는 포스콜린이다.
- [0033] 본 발명에서 cAMP 경로 활성화제로서 포스콜린이 사용될 경우, 기본 배양 배지에 5-15 μ M, 보다 구체적으로는 7-13 μ M, 가장 구체적으로는 9-11 μ M로 첨가될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 분열촉진 성장인자를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어 “분열촉진 성장인자(mitogenic growth factor)”는 특정 세포에서 분비되어 다른 세포의 유사분열 및 분화를 촉진하는 단백질을 의미한다. 보다 구체적으로는 상기 분열촉진 성장인자는 EGF(epidermal growth factor), FGF(fibroblast growth factor)10, TGF(transforming growth factor)- α , BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 및 KGF(keratinocyte growth factor)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성장인자이며, 보다 더 구체적으로는 EGF, FGF10 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되고, 가장 구체적으로는 EGF 및 FGF10의 조합이다.
- [0035] 본 발명에서 분열촉진 성장인자로서 EGF가 사용될 경우, 기본 배양 배지에 30 - 70 ng/ml, 보다 구체적으로는 40 - 60 ng/ml, 보다 더 구체적으로는 45 - 55 ng/ml로 첨가될 수 있다.

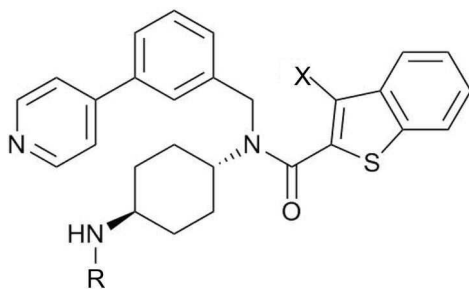
[0036] 본 발명에서 분열촉진 성장인자로서 FGF10이 사용될 경우, 기본 배양 배지에 70 - 130 ng/ml, 보다 구체적으로는 80 - 120 ng/ml, 보다 더 구체적으로는 90 - 110 ng/ml로 첨가될 수 있다.

[0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 니코틴아마이드를 추가적으로 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 배지 조성물에 니코틴아마이드가 추가적으로 포함될 경우 인간 미뢰 줄기/전구 세포 등의 미분화 세포를 응집된 3차원 형태로 유지하면서 더욱 효율적으로 성장 및 확장시킬 수 있음을 발견하였다. 따라서, 니코틴아마이드가 추가적으로 포함된 본 발명의 배양액(이하 “제1 배양액”이라 칭함)은 오가노이드의 성장 또는 확장을 촉진하기 위한 배지이며, 이에 “성장용 배지” 또는 “확장용 배지”로 지칭될 수 있다.

[0039] 니코틴아마이드가 포함될 경우, 기본 배양 배지에 6 - 14 mM, 보다 구체적으로는 7 - 13 mM, 보다 더 구체적으로는 8 - 12 mM, 가장 구체적으로는 9 - 11 mM로 첨가될 수 있다.

[0041] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 IL-4 (interleukin-4) 및 소닉 헤지호그(sonic hedgehog) 아고니스트를 추가적으로 포함한다. 보다 구체적으로는, 상기 소닉 헤지호그(sonic hedgehog) 아고니스트는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다:

[0042] **화학식 1**



[0043]

[0044] 상기 화학식에서, R은 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이고, X는 할로젠이다.

[0045] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다. C₁-C₃ 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C₁-C₃ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0046] 본 명세서에서 용어 “할로젠”은 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 포함한다.

[0047] 가장 구체적으로는, 상기 화학식 1에서 R은 C₁ 알킬이고, X는 Cl이다. R이 C₁ 알킬이고, X가 Cl인 화학식 1 화합물은 SAG(Smoothened Agonist)이다.

[0048] 이와 같이 본 발명의 미뢰 오가노이드 배양용 배지 조성물에 IL-4 및 SAG가 추가적으로 포함될 경우(이하 “제2 배양액”이라 칭함), 오가노이드 내 잔여 미분화 세포가 성체 미뢰 세포(taste bud cell)로 분화되는 것을 촉진 시킴으로써 미분화 세포의 비율이 크게 감소하고 생체 내에서의 미뢰의 기능 및 표현형을 보다 잘 재현하는 우수한 오가노이드를 수득할 수 있다

[0049] 따라서, 본 발명의 제2 배양액은 “오가노이드의 분화 유도용 배지” 또는 “오가노이드 내 미분화 세포의 인간 미뢰 세포로의 분화 유도용 배지”로 지칭될 수 있다.

[0050] SAG가 포함될 경우, 기본 배양 배지에 0.5 - 2 μM, 보다 구체적으로는 1 - 2 μM, 가장 구체적으로는 약 1 μM로 첨가될 수 있다.

[0051] IL-4가 포함될 경우, 기본 배양 배지에 50 - 150 ng/mL, 보다 구체적으로는 70 - 130 ng/mL, 가장 구체적으로는 90-110 ng/mL로 첨가될 수 있다.

[0053] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 혀 조직로부터 분리된 성체 줄기세포를 상술한 본 발명의 배지 조성물에서 배양하는 단계를 포함하는 인간 미뢰(taste bud) 오가노이드의 제조 방법을 제공한다.

[0054] 본 발명에서 이용되는 배지 조성물에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재 생략한다.

- [0055] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 혀 조직은 성곽유두(circumvallate papillae)이다.
- [0056] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 제조 방법은 배양 개시 후 2일 내지 5일 동안 ROCK 억제제를 배지에 첨가하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0057] 본 명세서에서 용어 “ROCK 억제제”는 rho 키나아제(rho-associated protein kinase, ROCK)의 발현 또는 활성을 억제하는 다양한 천연 또는 합성 분자를 의미하며, 예를 들어 Y-27632, RKI-1447, GSK429286A 및 Y-30141를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 ROCK 억제제는 Y-27632이다.
- [0058] 본 발명에서 ROCK 억제제로서 Y-27632가 사용될 경우, 본 발명의 배양 배지에 5-30 μM , 보다 구체적으로는 5-20 μM , 보다 더 구체적으로는 5-15 μM 로 첨가될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 오가노이드의 제조 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [0060] (a) 혀 조직로부터 분리된 성체 줄기세포를 제1 배양액의 배지 조성물에서 배양하는 단계; 및
- [0061] (b) 상기 단계 (a)의 결과물을 제2 배양액의 배지 조성물에서 배양하는 단계.
- [0062] 본 발명자들은 미뢰 오가노이드를 수득하기 위한 배양 전 과정에 걸쳐 확실적인 배양배지를 이용하지 않고, 니코틴아마이드가 추가되어 성장 및 체외 확장에 보다 최적화된 제1 배양액과, IL-4 및 SAG가 추가되어 미뢰 세포로의 분화 유도에 보다 최적화된 제2 배양액을 이원적, 순차적으로 사용하여 미뢰 오가노이드의 제작 효율을 극대화하였음은 상술한 바와 같다.
- [0063] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 단계 (b), 즉 제1 배양액에서 제2 배양액으로의 교체는 배양 개시 후 5일 내지 12일 후 수행된다. 보다 구체적으로는 배양 개시 후 6일 내지 11일 후 수행되며, 가장 구체적으로는 7일 내지 10일 후에 수행된다.

발명의 효과

- [0065] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0066] (a) 본 발명은 인간 미뢰(taste bud) 오가노이드 배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 인간 미뢰 오가노이드의 제조 방법을 제공한다.
- [0067] (b) 본 발명은 다각적인 실험을 통해 섬세한 감각기관인 인간 미뢰 특이적 필수 배양성분을 선별함으로써, 아직까지 제안된 적 없는 인간 미뢰 오가노이드를 위한 최적의 배양 환경을 제공한다.
- [0068] (c) 본 발명은 인간 미뢰의 유전자 발현 프로파일과 미각원에 대한 반응 등 생체 내 주요 기능 및 표현형이 완전히 재연되는 효율적인 오가노이드 제작에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0070] 도 1은 인간 미뢰 오가노이드 배양에 필요한 배양액 조성 선별하는 과정을 보여주는 그림으로, 각 성분들이 제거되었을 때 오가노이드의 정상적인 성장, 외형 및 표현형의 나타내는 그림이다. 도 1a는 부유(rich) 배지(A), EGF 제거 배지(B), SB202190 제거 배지(C) 및 FGF 제거 배지(D)를 각각 나타내며, 도 1b는 Wnt3a 제거 배지(E), Noggin 제거 배지(F), R-스폰딘 1 제거 배지(G) 및 니코틴아마이드 제거 배지(H)를 각각 나타내고, 도 1c는 A83-01제거 배지(I) 및 포스콜린 제거 배지(J)를 각각 나타낸다.
- 도 2는 단일 성분이 제거되었을 때, 오가노이드 성장이 멈추는 주(week)를 조사한 결과를 보여주는 그림이다. W: Wnt3a-CM, E: EGF, N: Noggin, R: R-스폰딘(spondin)-1-CM, F: FGF10, Ni: 니코틴아마이드, Ti: A83-01, FSK: 포스콜린
- 도 3은 인간 미뢰 오가노이드에서 미뢰 세포(taste bud cell) 마커의 발현여부를 보여주는 그림이다. Lgr5 및 Lgr6: 줄기세포 마커; K8: 미뢰내(intragemmal) 미뢰 세포마커; NTPdase: I형 미각세포 마커; T1R1, T1R2, T1R3, Gustducin, PLCb2, TRPM5: II형 미각세포 마커; SNAP25: III형 미각세포 마커
- 도 4는 인간 미뢰 오가노이드를 H&E 염색한 결과를 보여주는 그림이다. 중앙에 미각 세포들이 들어있는 미뢰내 구조와 전구세포들이 있는 미뢰 주변 구조로 구분되는 구조를 나타낸다.
- 도 5는 인간 미뢰 오가노이드에서 기능적 미뢰 세포 전구 세포 단백 마커의 발현 여부를 면역 형광법으로 보여주는 그림이다. SOX2: 미뢰 세포 전구 세포 마커, Sonic Hedgehog: 미뢰 세포 전구 세포 마커

도 6은 인간 미뢰 오가노이드에서 분화된 미뢰 세포 단백 마커의 발현 여부를 면역 형광법으로 보여주는 그림이다. Car4: type III 미뢰 세포 마커, SNAP25: type III 미뢰 세포 마커, alpha-transducin (Gta): type II 미뢰 세포 마커, TRPM5: type II 미뢰 세포 마커, K8: 미뢰 내 마커, GLAST: type I 미뢰 세포 마커

도 7은 미각 자극에 대한 인간 미뢰 오가노이드의 칼슘 반응을 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험방법

인간 성곽유두 표본

인간 성곽유두(circumvallate papillae)는 설 기저부(tongue base) 수술을 한 환자로부터 수득하였다. 환자의 임상시료 수집 및 사용에 대해 연세대학교 의과대학 연구심의위원회(IRB)의 승인을 받았으며, 연구에 참여한 환자의 동의를 받았다.

인간 미뢰(taste bud) 오가노이드 배양

수술 직후, 절개한 성곽유두 및 주변조직을 얼음 위에 올려놓고 기본 배지(1 x GlutaMax 및 10mM HEPES가 보충된 개량 Advanced DMEM/F12)로 옮겼다. 수집된 조직을 기본배지와 함께 세척하고 정교한 가위로 다듬었다.

DMEM(2mg/ml)에 넣은 미리 데워진 Dispase II를 조심스럽게 상피 아래로 주사하고 37°C에서 15분간 배양하였다. 미뢰(taste bud)를 포함한 상피를 조직으로부터 벗겨낸 후 0.25% 트립신-EDTA와 함께 다 37°C에서 30분간 배양하여 용해시켰다. 용해된 상피를 불에 연마한 유리 피펫으로 피펫팅하여 추가적으로 해리시킴으로써 단일세포 현탁액을 제작하였다.

수득한 세포 현탁액을 매트릭젤에 포매하고 24-웰 플레이트의 각 웰에 10,000 - 50,000 세포/웰의 밀도로 플레이트팅하였다. 매트릭젤 함유 세포를 응고시킨 뒤 인간 미뢰 오가노이드 성장 배지를 각 웰에 첨가하였다.

성장 배지는 1X GlutaMax, 10mM HEPES, 2% B-27, 1% N-2, 1mM N-아세틸시스테인, 50% Wnt3a-조건화된 배지, 10% R-스폰딘(spondin)-1-조건화된 배지, 50 ng/ml EGF, 100 ng/ml 노긴(Noggin), 100 ng/ml FGF10, 10 mM 니코틴아마이드, 5 mM A83-01 및 10 μ M 포스콜린(Forskolin)이 보충된 개량 Advanced DMEM/F12를 그 조성으로 한다.

최초 3일 간의 배양에서, 10 μ M Y-27632를 배지에 첨가하였다. 배지는 3일마다 교체하였으며 오가노이드는 0.25% 트립신-EDTA로 5분간 용해시키고 새로운 24 웰 플레이트에 다시 씨딩함으로써 4주마다 계대배양하였다.

이후, 인간 미뢰 세포로의 분화 최적화를 위해 계대배양 후 초기 7 - 10일 동안 성장 배지에 배양하다가, 니코틴아마이드가 제거되면서 SAG(1 μ M)과 IL-4 (100 ng/mL)이 추가적으로 첨가된 분화 최적화 배지로 교체하여 배양하였다.

[0086]

RNA 분리 및 역전사 PCR

RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 인간 미뢰 오가노이드로부터 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA의 역전사는 SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 합성된 cDNA를 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 증폭하였다.

표 1

mRNA 검출에 사용된 프라이머

유전자	정방향	역방향
Lgr4	GCTGGATGACAACAGCTTGA	TTCCCCACAAAAGACAGAGG
Lgr5	CTTCCAACCTCAGCGTCTTC	CTGGACGGGGATTCTGTGA

[0089]

Lgr6	GATGTGTGCCAGCTTCTTCA	GGAAATGCCAGTCAAGGTGT
K14	GAAGTGAAGATCCGTGACTGG	GCAGAAGGACATTGGCATTG
K8	TGCCTCTACCATGTCCATCA	TCCAGGAACCGTACCTTGTC
NTPDase 2	CTGGGTGACTGCCAACTACC	GCTGTGGGTGTAGACTCGG
TAS1R1	CGGAGTCTTCTCTGACTTCA	CCGTGGAGTTGTTTATCTCCTC
TAS1R2	CGTCGTGGTTCGTGTTCTCG	CACTCGCGGAAGTCACTGAAG
TAS1R3	CCGCCTACTGCAACTACACG	CTAGCACCGTAGCTGACCTG
GNAT3	ATGAGGACCAACGACAAC	GCGTAAGCTGCTGAGTCATTG
TRPM5	GTGACCTGGAGGAGGTGATG	AGCAGGCTCTTGCCTGAC
PLCb2	CACCCAGGGGCTATAAGAG	GGACAGGGTTGAGCAGAGAC
SNAP25	AAAAAGCCTGGGGCAATAAT	AGCATCTTTGTTGCACGTTG
K4	GTGGAGATTGACCCTGAGATC	TCATTGCCCAAGGTATCTAGC
K13	TGCCAGAACCAAGAGTACAAG	GCCTACGGACATCAGAAGTG

[0091] 면역형광

[0092] 오가노이드를 4% 파라포름알데히드로 고정하고 30% 수크로스로 동결보존하였다. 이후 오가노이드를 Optimal Cutting Temperature(Leica)를 포함하는 몰드에서 냉각시켰다. 냉각조직절편기(cryotome)를 이용하여 10 μm 오가노이드 절편을 제작하였다. 하기 표 2의 항체를 이용하여 표준 절차를 통해 면역염색을 수행하였다. Images of 염색된 오가노이드 절편의 이미지를 공초점 현미경(LSM 700, Zeiss)을 이용하여 촬영하였다.

표 2

[0093] 사용된 1차 항체.

항체	입수처	Identifier
항-인간 K8	DSHB	Troma-I
항-인간 GLAST	Chemicon	AB1783
항-인간 TRPM5	자체 제작	
항-인간 gustducin	Aviva System Biology	OAEB00418
항-인간 PLCβ2	Santa Cruz	sc-515912
항-인간 SNAP25	Sigma	S9684
항-인간 Car4	R&D	AF2414
항-인간 K13	Abcam	Ab198584()

[0095] 칼슘 이미지

[0096] 오가노이드를 폴리-D-라이신이 코팅된 커버슬립에 플레이팅하여 흡착되도록 하였다. 흡착된 세포를 변형된 Tyrode 완충액에서 30분 간 fura-2 염료를 로딩하였다. 이후 세포를 미각 자극제를 함유하는 Tyrode 완충액이 흐르는 관류 챔버에 위치시켰다. 본 발명에서 사용된 자극제는 데나토늄(denatonium, 10 mM) 및 수크로스(25 mM)이다. 340 및 380 nm의 여기 파장에서 형광 이미지를 획득하였다.

[0098] 실험결과

[0099] 인간 미뢰 오가노이드 배양법 및 배양액 조성 결정

[0100] 절개된 인간 성곽유두 미뢰를 기본 배지(1X GlutaMax 및 10mM HEPES가 보충된 개량 Advanced DMEM/F12)에 담아서 저온상태로 실험실로 이동한 후, 절개 및 효소 용해를 통해 미뢰 세포들을 단일 세포로 해리하였다. 이들을 마트릭젤과 혼합하여 마트릭젤 돔(dome) 형태로 24 웰 플레이트의 각 웰에서 배양하였다. 인간 미뢰 오가노이드를 만들 줄기세포의 줄기성(stemness)을 유지함과 동시에 오가노이드의 성장 및 분화를 가능케 할 배양액 조성을 결정하기 위해 해리된 인간 미뢰 세포들이 마트릭젤 돔 안에서 성장하는 배양형태에서 다양한 배양 성분의 조합을 시험하였다. 배양액의 부피는 250 ml로 하였다. 먼저 Hans Clevers 등이 상피 세포 오가노이드 배양을 위해 개발한 공통배양액 조성(Wnt3a-CM, R-스폰딘-1-CM, Noggin, EGF)(*GASTROENTEROLOGY* 141:(2011)1762-1772)에 각 개별 오가노이드(내장, 위, 간, 췌장 등) 배양에 특수하게 요구되는 개별 인자들을 모두 포함시킨 ‘부유(rich)’ 배지를 만든 이후, 이를 기반으로 인간 미뢰 오가노이드 배양에 필요한 요소들을 선별해 나가는 실험을 진행하였다. 처음 ‘부유’ 배양액은 기본 배지(1 x GlutaMax 및 10mM HEPES가 보충된 개량 Advanced

DMEM/F12)에 Wnt3a-조건화된 배지(CM), R-스폰딘-1-CM, EGF, Noggin, FGF10, 가스트린, 니코틴아마이드, A83-01, SB202190, 포스콜린이 포함된 것이며, 이 조성으로 배양했을 때 인간 미뢰 오가노이드가 배양되는 것을 확인하고(도 1a), 이후 배양액에서 이들 개별 인자들을 하나씩 제거하는 실험을 수행하였다. 도 1에서 보는 바와 같이, EGF가 제거되면 인간 미뢰 오가노이드의 모양이 변하는 것을 알 수 있고(도 1a의 B), FGF가 제거되면 인간 미뢰 오가노이드가 성장이 끝까지 유지되지 않고 멈추게 되며(도 1a의 D), p38 억제제인 SB202190(도 1a의 C) 또는 가스트린이 제거되었을 때는 ‘부유’ 배양액으로 키웠을 때와 성장에 별다른 차이가 없었다. 특히, FGF는 제거에 의해 인간 미뢰 오가노이드가 성장을 멈추는 효과를 확인하는데 다수의 계대가 지나야하는 것을 알 수 있다(도 1a의 D). 또한, 도 2에서보는 것과 같이, Wnt3a-CM, Noggin, R-스폰딘-1-CM, 니코틴아마이드, A83-01, 포스콜린이 제거되었을 때, 인간 미뢰 오가노이드가 지속적으로 배양되지 않고 멈추는 것을 알 수 있으며, 이들은 제2 계대배양에서부터 이미 성장이 멈추는 것을 확인할 수 있다(도 1b 및 c). 각 인자의 제거 시 인간 미뢰 오가노이드가 성장할 수 있는 기간을 주 단위로 측정하였을 때, Wnt3a-조건화된 배지(CM), R-스폰딘-1-CM, Noggin, FGF10, 니코틴아마이드, A83-01, 포스콜린을 제거하였을 때는 지속적으로 성장하지 못하고, 제거되는 인자마다 다양한 시점에 성장이 정지하는 것을 알 수 있다(도 2). 이를 통해, 인간 미뢰 오가노이드 배양에 필요한 배양액 조성으로 기본 배지(1 x GlutaMax 및 10mM HEPES가 보충된 개량 Advanced DMEM/F12)에 Wnt3a-CM, R-스폰딘-1-CM, EGF, Noggin, FGF10, 니코틴아마이드, A83-01, 포스콜린이 첨가된 것을 인간 미뢰 오가노이드 배양액으로 일차 선정하였다(표 3).

표 3

[0102]

인간 미뢰 오가노이드 성장용 배양액의 최종 조성

기본 배지 (성체 줄기세포 배양용 일반적 배지)	
Advanced DMEM/F12+Glutamax + HEPES	
B27	2%
N2	1%
N-아세틸시스테인	1mM
인간 미뢰 오가노이드 배양용 배지	
Wnt3a 조건화 배지	50% (배지 부피)
R-스폰딘-1 조건화 배지	10% (배지 부피)
EGF	50 ng/mL
Noggin	100 ng/mL
FGF10	100 ng/mL
니코틴아마이드	10 mM
A83-01	5 μ M
Forskolin	10 μ M

[0104]

상기 성장용 배지로 오가노이드를 배양한 결과, 성장 및 줄기성(stemness)이 잘 유지될 뿐 아니라 확장성도 보장되나, 오가노이드 내 최종 목표 세포형인 미뢰 세포 및 직전 전구세포(precursor)의 형성 효율이 높지 않았다. 따라서, 분화에 방해가 되는 성분을 제거 후 분화를 촉진하는 성분을 추가하기 위해 선별 실험을 진행하였다. 그 결과, 분화 최적화 배지에서는 니코틴아마이드를 제거하고, 소닉 헤이호그(Sonic Hedgehog) 아고니스트인 SAG(Smoothened agonist)와 IL-4를 각각 1 μ M 및 100 ng/mL를 첨가한 배지가 분화 유도에 가장 효과적인 것으로 확인되어 분화용 배양액의 최종 조성으로 선정하였다(표 4).

표 4

[0106]

인간 미뢰 오가노이드 분화용 배양액의 최종 조성

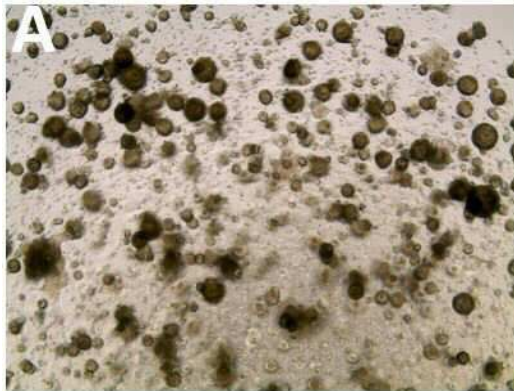
기본 배지 (성체 줄기세포 배양용 일반적 배지)	
Advanced DMEM/F12+Glutamax + HEPES	
B27	2%
N2	1%
N-아세틸시스테인	1mM
인간 미뢰 오가노이드 배양용 배지	
Wnt3a 조건화 배지	50% (배지 부피)
R-스폰딘-1 조건화 배지	10% (배지 부피)
EGF	50 ng/mL

Noggin	100 ng/mL
FGF10	100 ng/mL
A83-01	5 μ M
Forskolin	10 μ M
SAG	1 μ M
IL-4	100 ng/mL

- [0108] 결론적으로, 오가노이드를 분화시키기 위해서는 충분한 오가노이드의 성장이 선행되어야 하기 때문에, 계대 배양 후 초기 7-10일 동안은 성장용 배양 배지(표 3)에서 배양하고, 이후에는 인간 미뢰 오가노이드 분화용 배지(표 4)에서 배양하는 이원적, 순차적 배양 시스템을 통해 우수한 오가노이드의 제조 효율을 극대화할 수 있었다.
- [0110] 인간 미뢰 오가노이드 발현 유전자 검증 및 구조 검증
- [0111] 본 발명의 배양액으로 배양된 인간 미뢰 오가노이드에서 인간 미뢰 발현 유전자들이 발현하는지를 확인하기 위해 미뢰 오가노이드에서 RT-PCR을 수행한 결과, 줄기세포 마커인 Lgr5 및 Lgr6의 발현을 확인하였으며, K8과 같은 미뢰내(intragemmal) 세포 마커가 발현되는 것을 관찰함으로써, 미각 세포가 들어있는 미뢰 부위가 포함되어 있음을 확인할 수 있었다(도 3). 아울러, I형 미각세포 마커인 NTPdase, II형 미각세포 마커인 T1R1, T1R2, T1R3, 거스트듀신(Gustducin), PLCb2, TRPM5, III형 미각세포 마커인 SNAP25가 모두 발현하는 것을 볼 수 있었다(도 3). 또한, 인간 미뢰 오가노이드가 미-미각세포 상피 세포 및 전구세포들이 있는 미뢰 외(extra-gemmal) 세포와 미각 세포가 포함된 미뢰 내(intra-gemmal) 세포 구조로 나뉘는지 확인하기 위해 H&E 염색을 수행한 결과, 두 개의 구조로 뚜렷하게 구분되는 것을 알 수 있었다(도 4).
- [0112] 면역 형광 염색을 수행한 결과, 기능적 미뢰 세포 전구 세포 마커인 SOX2와 Sonic Hedgehog의 발현을 확인할 수 있었으며(도 5), 분화된 미뢰 세포 마커인 GLAST (type I 미뢰 세포), α -transducin (type II 미뢰세포), TRPM5 (type II 미뢰세포), Car4 (type III 미뢰세포), SNAP25 (type III 미뢰세포) 발현을 확인할 수 있었다(도 6).
- [0114] 인간 미뢰 오가노이드의 미각원에 대한 칼슘 반응
- [0115] 인간 미뢰 오가노이드가 사람의 미뢰가 반응하는 미각원(Tastant)에 반응하는지 확인해보기 위해 인간 미뢰 오가노이드에 fura-2 칼슘 표지자 염료를 흡수시킨 후, 수크로스(단맛)와 데나토늄(denatonium)(쓴맛)를 흘려주어 오가노이드 세포에서 칼슘 반응이 나타나는지를 확인하였다. 그 결과, 수크로스(25mM)와 데나토늄(10mM)으로 자극하였을 때, 인간 미뢰 오가노이드에서 일시적 칼슘 반응이 즉각적으로 잘 형성되는 것을 확인할 수 있었다(도 7). 이는 인간 미뢰 오가노이드가 인간 미뢰처럼 맛에 반응하는 기능성을 가지고 있음을 나타낸다.
- [0117] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

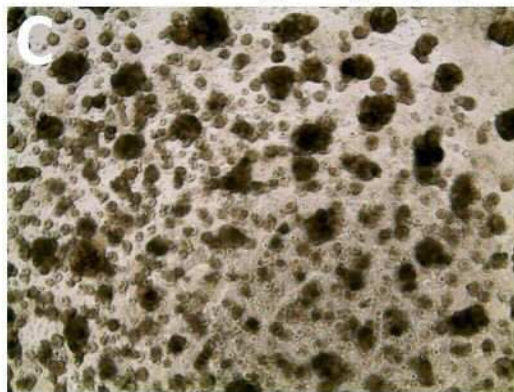
도면1a



Complete medium, passage 6, day 19



-EGF, passage 6, day 19



-SB202192, passage 6, day 19

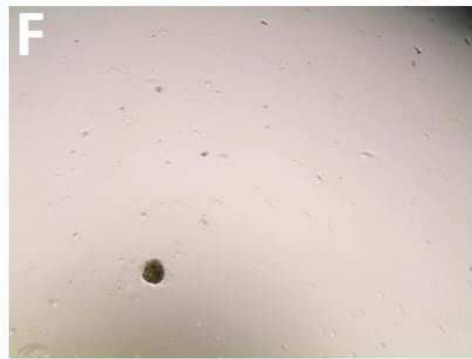


-FGF10, passage 6, day 19

도면1b



-Wnt3a, passage 2, day 5



-Noggin, passage 2, day 5



-R-spondin1, passage 2, day 5



-Nicotinamide, passage 2, day 5

도면1c

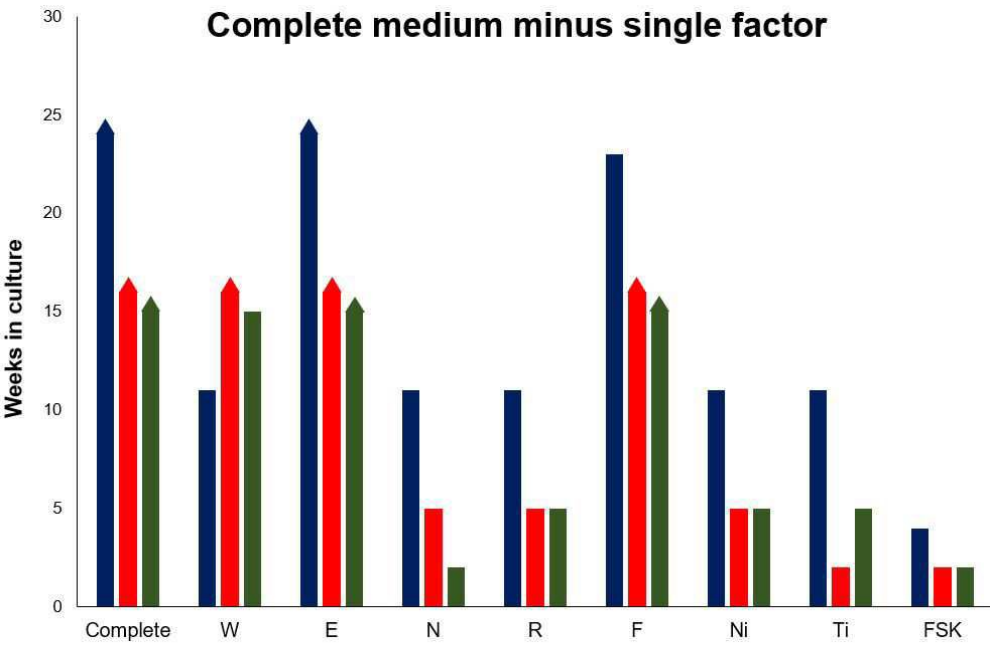


-A8301, passage 2, day 5

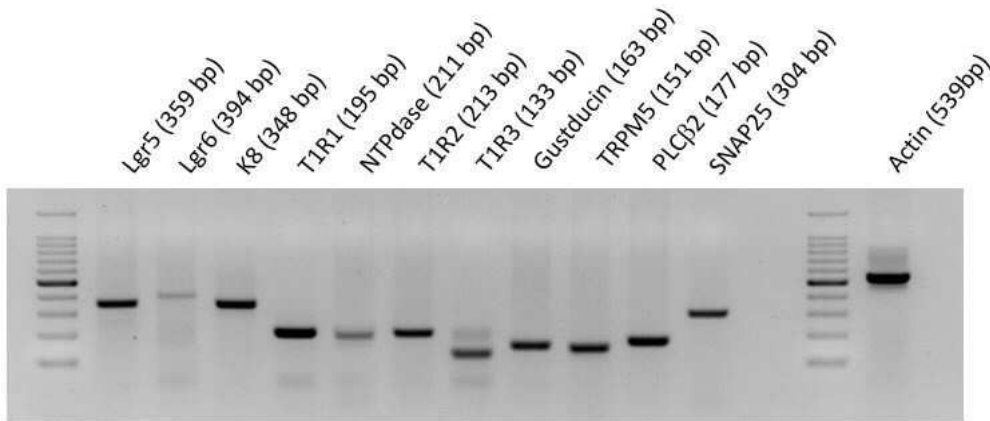


-Forskolin, passage 1, day 21

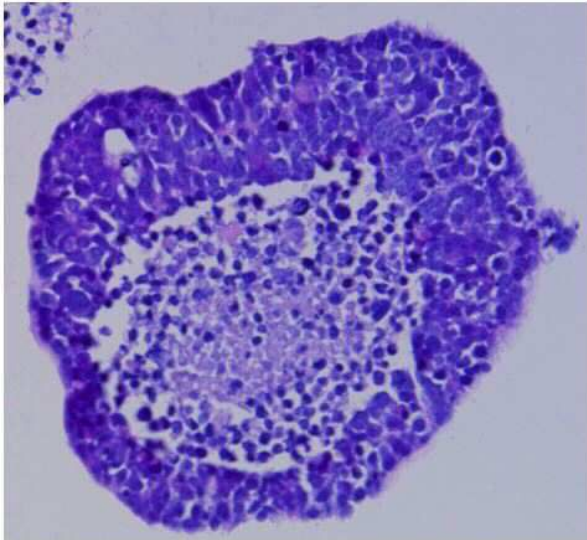
도면2



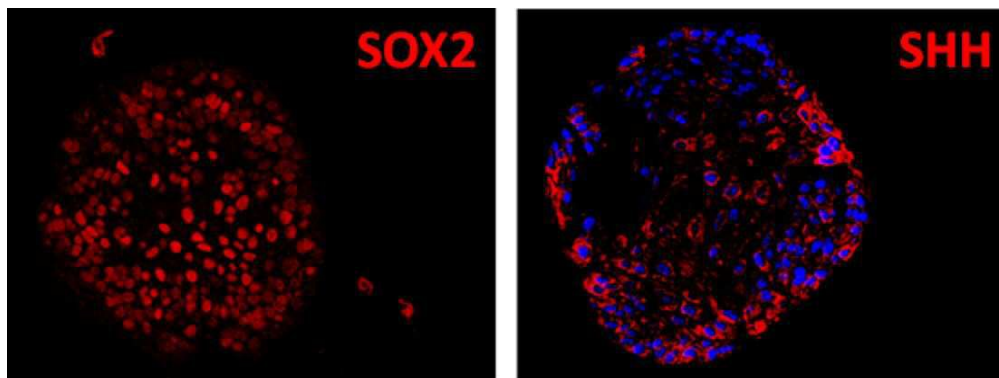
도면3



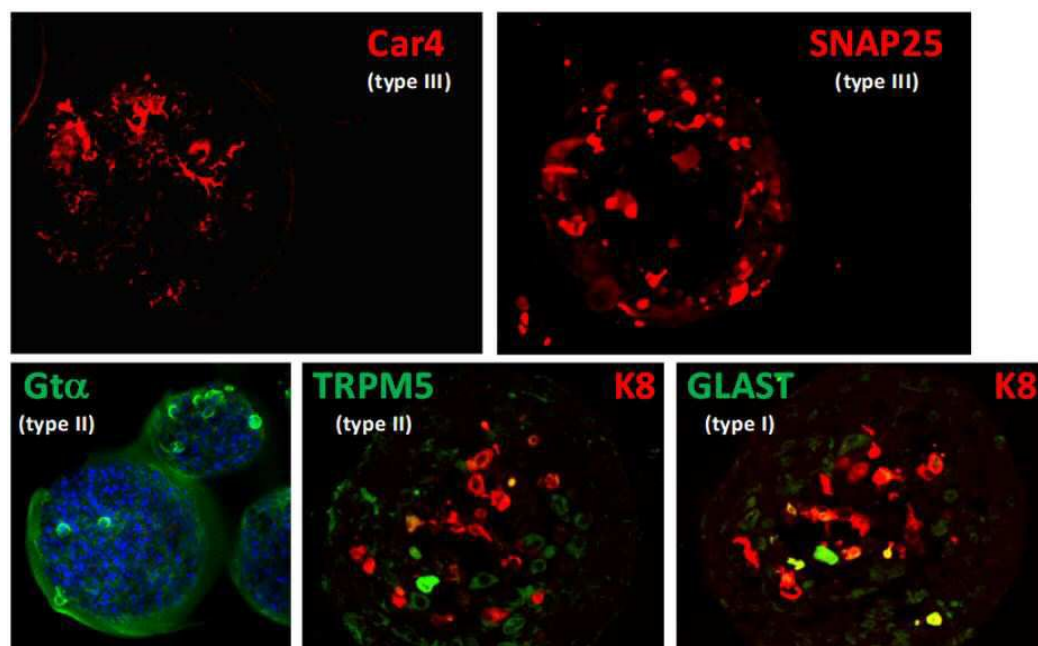
도면4



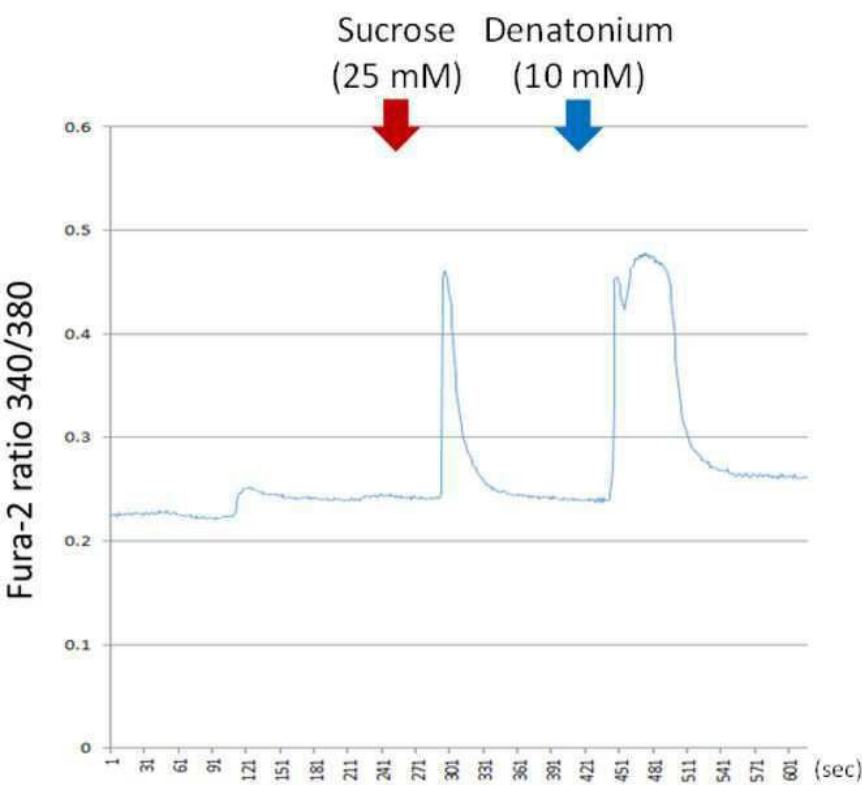
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University
- <120> A Composition for Culturing Human Taste Bud Organoid
- <130> HPC8737
- <160> 30
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Lgr4 F primer
- <400> 1
- gctggatgac aacagcttga
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Lgr4 R primer
- <400> 2

ttccccacaa aagacagagg	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Lgr5 F primer	
<400> 3	
cttccaacct cagcgtcttc	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Lgr5 R primer	
<400> 4	
ctggacgggg atttctgtta	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Lgr6 F primer	
<400> 5	
gatgtgtgcc agcttcttca	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Lgr6 R primer	
<400> 6	
ggaaatgcca gtcaaggtgt	20
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	K14 F primer	
<400>	7	
	gaagtgaaga tccgtgactg g	21
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	K14 R primer	
<400>	8	
	gcagaaggac attggcattg	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	K8 F primer	
<400>	9	
	tgcctctacc atgtccatca	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	K8 R primer	
<400>	10	
	tccaggaacc gtaccttgtc	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NTPDase 2 F primer	
<400>	11	
	ctgggtgact gccaactacc	20
<210>	12	
<211>	19	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NTPDase 2 R primer
 <400> 12
 gctgtgggtg tagactcgg 19
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TAS1R1 F primer
 <400> 13
 cggagtcttc tctgacttc a 21
 <210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TAS1R1 R primer
 <400> 14
 ccgtggagtt gtttatctcc tc 22
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TAS1R2 F primer
 <400> 15
 cgtcgtggtc gtgttctcg 19
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TAS1R2 R primer
 <400> 16
 cactcgcgga actcactgaa g 21
 <210> 17

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TAS1R3 F primer	
<400>	17	
	ccgcctactg caactacacg	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TAS1R3 R primer	
<400>	18	
	ctagcaccgt agctgacctg	20
<210>	19	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GNAT3 F primer	
<400>	19	
	atgaggacca acgacaac	18
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GNAT3 R primer	
<400>	20	
	gcgtaagctg ctgagtcatt g	21
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TRPM5 F primer	
<400>	21	

gtgacctgga ggaggtgatg	20
<210> 22	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TRPM5 R primer	
<400> 22	
agcaggtctt tgcgtgac	18
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PLCb2 F primer	
<400> 23	
caccccaggg gctataagag	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PLCb2 R primer	
<400> 24	
ggacagggtt gagcagagac	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SNAP25 F primer	
<400> 25	
aaaaagcctg gggcaataat	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> SNAP25 R primer
 <400> 26
 agcatctttg ttgcacgttg 20
 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K4 F primer
 <400> 27
 gtggagattg accctgagat c 21
 <210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K4 R primer
 <400> 28
 tcattgccca aggtatctag c 21
 <210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K13 F primer
 <400> 29
 tgccagaacc aagagtacaa g 21
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K13 R primer
 <400> 30
 gcctacggac atcagaagtg 20