(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월24일
(11) 등록번호 10-2146274
(24) 등록일자 2020년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/38* (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0679 (2013.01)
A61K 35/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0059639
(22) 출원일자 2019년05월21일
심사청구일자 2019년05월21일
(56) 선행기술조사문헌
US20170292116 A1*
US20170362573 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 마이크로바이오틱스
서울특별시 서초구 서초대로 397 ,A동5층509호 (서초동,부띠크모나코)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
박철순
충청북도 충주시 신호5길 1
용동은
서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌 A705
(74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **장관 오가노이드의 제조 방법 및 이의 용도**

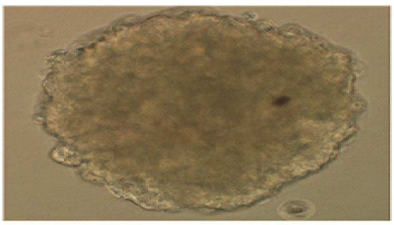
(57) 요 약

본 발명은 장관 오가노이드의 제조 방법에 관한 것으로, 골 형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP) 및 헤지호그(Hedgehog, HH) 중 적어도 하나의 존재 하에서 장 신경계(enteric nervous system; ENS) 세포를 계대 배양하여, 상기 장 신경계의 성숙을 유도하는 단계를 포함한다.

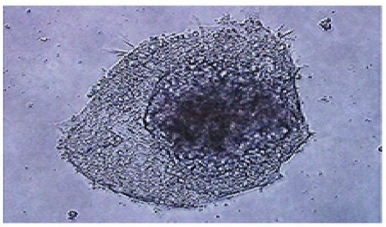
본 발명에서 제조된 장관 오가노이드는 성체(adult)가 가지는 체내 실제 장관과 영양분 및 약물 흡수 기능, 점액 분비, 호르몬 분비 등 실제 기능성이 매우 유사하여, 조직 치료제나 장 관련 질환의 치료를 위한 약물 스크리닝의 용도 등의 다양한 용도에 적용이 가능하다.

대 표 도 - 도20

(a)



(b)



(52) CPC특허분류
A61P 1/00 (2018.01)
C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/15 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/16 (2013.01)
C12N 2501/19 (2013.01)
C12N 2501/41 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C1324
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성R&D
연구과제명 글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축
기 여 율 1/1
주관기관 연세대학교 세브란스병원
연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

골 형성 단백질 4(Bone morphogenetic protein 4, BMP4) 및 소닉 헤지호그(Sonic Hedgehog; SHH)의 존재 하에서 장 신경계(enteric nervous system; ENS) 세포를 계대 배양하여, 상기 장 신경계의 성숙을 유도하는 단계를 포함하는, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 장 신경계(ENS) 세포는 신경능선 세포(neural crest cell)와 후장(hind gut) 세포를 공배양(co-culture)하여 분화 유도된 것인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 공배양은 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 인자(growth factor) 중 적어도 하나의 존재 하에서 수행되는, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 성장 인자는 bFGF(basic fibroblast growth factor) 및 EGF(epidermal growth factor) 중 적어도 하나인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 공배양은 3차원 배양 방법에 의해 수행되는, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 공배양 기간은 2 일 내지 14 일 동안 수행되는 것인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 신경능선 세포는 외배엽성 세포(ectoderm cell)를 액티빈(activin) 억제제 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 분화 유도된 것인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 액티빈 억제제는 SB431542, 폴리스타틴(Follistatin), A8301, DMH1, K02288 및 SB505124로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 Wnt 신호 활성자는 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-(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-Chioro-4-methylphenyl)-5-(4-ni-trophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyi)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 이상인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 외배엽성 세포의 배양 기간은 12 시간 내지 6 일인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 외배엽성 세포는 줄기세포를 골 형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP) 억제제, 액티빈(activin) 억제제 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 분화 유도된 것인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 줄기세포는 인간 배아 줄기세포(hESC)인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 골 형성 단백질 억제제는 LDN-193189(4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline), 도르소몰핀(Dorsomorphin; 6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine) 및 노긴(Noggin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 16

제4항에 있어서,

상기 후장 세포는 내배엽성 세포(endoderm cell)를 섬유모세포 성장인자 4(fibroblast growth factor 4; FGF4) 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 분화 유도된 것인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 내배엽성 세포의 배양 기간은 1 일 내지 10 일인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 내배엽성 세포는 줄기세포를 TGF-β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 분화 유도된 것인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 TGF-β 패밀리 단백질은 TGF-β, 액티빈(activin), 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 분화 인자(Growth and Differentiation Factor; GDF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 줄기세포의 배양 기간은 12 시간 내지 7 일인, 장관 오가노이드의 제조 방법.

청구항 21

제1항 및 제4항 내지 제20항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 장관 오가노이드.

청구항 22

제21항의 장관 오가노이드를 포함하는 조직 치료제.

청구항 23

제21항의 장관 오가노이드를 이용하여 장 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 방법은 상기 장관 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 25

제23항에 있어서,

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) 및 셀리악 병(Celiac disease)으로부터 선택되는 것인, 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 장관 오가노이드의 제조 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 공

통적인 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, 치료용도로 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 장선와-융털 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 성숙된 장관 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 장관(intestinal) 오가노이드(organoid)를 제조하는 방법과 이에 의해 제조된 장관 오가노이드의 다양한 용도에 관한 것이다.

[0010] **장관 오가노이드의 제조 방법**

[0011] 본 발명에서는 우선, 줄기세포를 외배엽성 세포로 분화하는 단계를 수행할 수 있다.

[0012] 본 발명에서 상기 "줄기세포(stem cell)"는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 줄기세포는 세포학적 유래에 따라 수정란에서 유래하는 배아 줄기세포(embryonic stem cells)와 성체 내에 존재하는 각 기관에서 유래하는 성체 줄기세포(adult stem cells)로 나눌 수 있다. 본 발명에서 상기 줄기세포로는 인간 배아 줄기세포(hESC)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에서는 상기 줄기세포를 골 형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMP) 억제제, 액티빈(activin) 억제제 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 외배엽성 세포로 분화를 유도할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질 억제제로는 LDN-193189(4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline), 도르소몰핀(Dorsomorphin; 6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine) 및 노긴(Noggin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에서 상기 액티빈 억제제로는 SB431542, 폴리스타틴(Follistatin), A8301, DMH1, K02288 및 SB505124로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성자는 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-(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-Chioro-4-methylphenyl)-5-(4-ni-trophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyi)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 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 상기 외배엽성 세포로의 분화 시 배양 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), RPMI 1640, 윌리암 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. 여기서 상기 배지에 넉아웃 혈청 대체제(Knock out serum replacement)를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명에서 상기 외배엽성 세포로의 분화 시 배양 기간은 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면 6 시간 내지 6 일, 12 시간 내지 4 일, 24 시간 내지 3일, 또는 1 일 내지 2 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에서는 상기와 같이 외배엽성 세포로의 분화가 유도되면, 상기 외배엽성 세포를 액티빈(activin) 억제제 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 신경능선 세포(neural crest cell)로 분화를 유도하는 단계를 수행할 수 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 액티빈 억제제로는 SB431542, 폴리스타틴(Follistatin), A8301, DMH1, K02288 및 SB505124로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성자는 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-(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-Chioro-4-methylphenyl)-5-(4-ni-trophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyi)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 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 상기 신경능선 세포로의 분화 시 배양 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), RPMI 1640, 윌리암 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.

[0023] 또한, 본 발명에서 상기 신경능선 세포로의 분화 시 배양 기간은 12 시간 내지 6 일, 24 시간 내지 5 일, 2 일 내지 4 일, 또는 3 일 내지 4 일 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[0024] 본 발명에서 상기와 같이 신경능선 세포로의 분화가 유도되면, 상기 신경능선 세포를 후장(hind gut) 세포와 공배양(co-culture)하여 장 신경계(enteric nervous system, ENS)로의 분화를 유도하는 단계를 수행할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 장 신경계로 분화 유도 시 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 인자(growth factor) 중 적어도 하나의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질로는 BMP 패밀리 단백질에 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 있다.

[0027] 또한, 본 발명에서 상기 성장 인자는 bFGF(basic fibroblast growth factor) 및 EGF(epidermal growth factor) 중 적어도 하나를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 상기 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 있다. 예를 들면, 공배양할 신경능선 세포 및 후장 세포를 배지에 생체적합성 스캐폴드와 함께 3차원적으로 배양하며 수행될 수 있다. 여기서 상기 생체적합성 스캐폴드는 세포와 친화성을 가지며 이른바 '세포 접착성'인 표면을 지닌 재료로 만들어지며 세포를 3차원적으로부착하고 배양시킬 수 있는 지지체를 의미한다. 본 발명에서 천연 유래 지지체의 예로는 알지네이트, 단백질, 콜라젠, 피브린, 히알루론산, 셀룰로오스 등이 있고, 합성 고분자 지지체의 예를 들면 폴리(알파-하이드록시산) 계열, 폴리(비닐알콜), 폴리안하이드라이드 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서 상기 장 신경계로의 분화 시 배양 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), RPMI 1640, 윌리암 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 B27 보충제(supplement), N2 보충제 및 G5 보충제 중 적어도 하나를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 상기 장 신경계로의 분화 시 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.

[0031] 본 발명에서 상기 장 신경계로의 분화 시 바람직하게는 상기 신경능선 세포와 후장 세포를 골 형성 단백질(BMP) 및 성장 인자의 존재 하에서 2 일 내지 4 일 동안 공배양한 후, 성장 인자의 존재 하에서 12 시간 내지 2 일 동안 공배양한 뒤, 골 형성 단백질(BMP)의 존재 하에서 2 일 내지 6 일 동안 공배양할 수 있다.

[0032] 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.

[0033] 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.

[0034] 본 발명에서는 상기 줄기세포를 TGF-β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 내배엽성 세포로 분화를 유도할 수 있다.

[0035] 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 있으나, 이에 제한되는

것은 아니다.

[0036] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성자는 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-(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-Chioro-4-methylphenyl)-5-(4-ni-trophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyi)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 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 상기 내배엽성 세포로의 분화 시 배양 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), RPMI 1640, 윌리암 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 소 혈청(FBS), B27 보충제(supplement), N2 보충제 및 G5 보충제 중 적어도 하나를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0038] 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 , 또는 3 일 내지 4 일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명에서 상기 내배엽성 세포로의 분화 시 바람직하게는 B27을 첨가한 배지에 상기 줄기세포를 TGF-β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성자의 존재 하에서 12 시간 내지 2 일 동안 배양한 뒤, 소 혈청이 추가된 배지에서 TGF-β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성자의 존재 하에서 12 시간 내지 2 일 동안 추가로 배양한 후 역시 소 혈청이 추가된 배지에서 TGF-β 패밀리 단백질 및 Wnt 신호 활성자의 존재 하에서 12 시간 내지 2 일 동안 추가로 배양하여 수행될 수 있다.

[0040] 본 발명에서는 상기와 같이 내배엽성 세포로의 분화가 유도되면, 섬유모세포 성장인자 4(fibroblast growth factor 4; FGF4) 및 Wnt 신호 활성자(Wnt signaling activator) 중 적어도 하나의 존재 하에서 배양하여 후장 세포로의 분화를 유도할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 상기 Wnt 신호 활성자는 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-(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-Chioro-4-methylphenyl)-5-(4-ni-trophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amine), TCS2002(2-ethyl-5-[3-[4-(methylsulfinyi)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 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에서 상기 후장 세포로의 분화 시 배양 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), RPMI 1640, 윌리암 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 소 혈청(FBS)을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0043] 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.

[0044] 본 발명에서 상기 신경능선 세포와 상기 후장 세포의 공배양으로 장 신경계로의 분화가 유도되면, 골 형성 단백질(BMP) 및 헤지호그(Hedgehog, HH) 중 적어도 하나의 존재 하에서 상기 장 신경계 세포를 계대 배양하여, 상기

장 신경계의 성숙을 유도하는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 장 신경계 세포의 계대 배양 단계를 수행하지 않는 경우, 뉴런(neuron)이 끊어지며 더 이상 성장하지 않는 문제점이 발생할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질로는 BMP 패밀리 단백질에 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 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 헤지호그 단백질로는 소닉 헤지호그(Sonic Hedgehog; SHH), 인디언 헤지호그(Indian Hedgehog; IHH) 및 데저트 헤지호그(Desert Hedgehog; DHH)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에서 상기 장 신경계의 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 B27 보충제(supplement), N2 보충제 및 G5 보충제 중 적어도 하나를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 장 신경계의 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.

[0050] 본 발명에서는 장 신경계의 성숙을 유도함으로써 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.

[0052] **장관 오가노이드의 장 신경계(ENS)의 성숙 유도용 조성물**

[0053] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 골 형성 단백질(BMP) 및 헤지호그(HH) 중 적어도 하나, 바람직하게는 상기 골 형성 단백질(BMP) 및 헤지호그(HH)를 모두 포함하는, 장관 오가노이드, 바람직하게는 장관 오가노이드의 장 신경계(ENS)의 성숙 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0054] 본 발명에서 상기 골 형성 단백질로는 BMP 패밀리 단백질에 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 있다.

[0055] 본 발명에서 상기 헤지호그 단백질로는 소닉 헤지호그(Sonic Hedgehog; SHH), 인디언 헤지호그(Indian Hedgehog; IHH) 및 데저트 헤지호그(Desert Hedgehog; DHH)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] **장관 오가노이드**

[0058] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 방법으로 제조된 장관 오가노이드를 제공한다.

[0059] 본 발명에서 제공하는 장관 오가노이드는 인간의 체내 장관에 매우 유사한 기능 및 형상을 가지고 있어 전 세계적인 동물실험 대체 모델에 대한 요구에 있어서 장 관련 질환 모델에 대안으로 사용될 수 있다.

[0061] **조직 치료제**

[0062] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 장관 오가노이드를 포함하는 조직 치료제에 관한 것이다.

[0063] 본 발명에서 상기 조직은 장관 조직을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] **장 관련 질환의 치료 방법**

[0066] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 장관 오가노이드를 목적하는 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 장 관련 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0067] 본 발명에서 상기 목적하는 개체란, 장 관련 질환이 발명하였거나 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 장관 오가노이드를 개체에게 투여함으로써 장 관련 질환을 효과적으로 치료할 수 있다면

개체의 종류는 제한없이 포함된다.

[0068] 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.

[0070] **장 관련 질환 치료제의 스크리닝 방법**

[0071] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 장관 오가노이드를 이용하여 장 관련 질환 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0072] 본 발명에서는 상기 장관 오가노이드에 피검 물질을 처리하는 단계를 수행할 수 있다.

[0073] 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 뉴클레오티드, 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.

[0074] 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.

[0075] 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

[0076] 본 발명에서는 장관 오가노이드를 용이하고 효율적으로 제조하는 방법을 제공하며, 이에 따라 제조된 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 장 관련 질환의 치료를 위한 약물 스크리닝의 용도 등의 다양한 용도에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 실시예 1에서 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도이다.

도 2는 실시예 1에서 내배엽성 세포로의 분화 유도 후 3일 경과하였을 때 얻어진 세포에서 OCT4, NANOG, SOX17 및 FOXA2의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이고, 이때 도 2의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 대조군을 나타내고, 오른쪽 열은 분화 유도된 세포의 결과를 나타낸 것이며, 여기서 상기 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

도 3은 실시예 1에서 내배엽성 세포로부터 후장 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도이다.

도 4의 A, B 및 C는 실시예 1에서 후장 세포로의 분화 유도 후 2일, 3일 및 4일 경과 후 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다. 여기서 스케일 바(scale bar)는 200 um에 해당한다.

도 5는 실시예 1에서 후장 세포로의 분화 유도 후 4일이 경과하였을 때 얻어진 세포에서 KLF5 및 CDX1의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 5의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 대조군을 나타내고, 오른쪽 열은 분화 유도된 세포의 결과를 나타낸 것이며, 여기서 상기 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

도 6은 실시예 1에서 후장 세포로의 분화 유도 후 4일이 경과하였을 때 얻어진 세포에서 CDX2의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 6의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 대조군을 나타내고, 오른쪽 열은 분화 유도된 세포의 결과를 나타낸 것이며, 여기서 상기 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

도 7은 실시예 2에서 인간 배아 줄기세포로부터 외배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도를 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 2에서 외배엽성 세포로의 분화 유도 후 2일 경과하였을 때 얻어진 세포에서 NESTIN 및 OTX2의 발

현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 8의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 대조군을 나타내고, 오른쪽 열은 분화 유도된 세포의 결과를 나타낸 것이며, 여기서 상기 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

도 9는 실시예 2에서 외배엽성 세포로부터 신경능선 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도를 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 2에서 신경능선 세포로의 분화 유도 후 4일 경과하였을 때 얻어진 세포에서 ZIC1, SOX10 및 FOXD3의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 10의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 대조군을 나타내고, 오른쪽 열은 분화 유도된 세포의 결과를 나타낸 것이며, 여기서 상기 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

도 11은 실시예 2에서 신경능선 세포로의 분화 유도 후 4일 경과 후 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다. 여기서 스케일 바(scale bar)는 200 um에 해당한다.

도 12는 실시예 3에서 상기 신경능선 세포와 후장 세포의 공배양을 통해 장 신경계를 유도하기 위한 실험 설계도를 나타낸 것이다.

도 13은 실시예 3에서 신경능선 세포와 후장 세포를 3차원으로 8일간 공배양한 뒤 얻어진 세포에서 LMX1A, PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준의 변화를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 13의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 대조군을 나타내고, 오른쪽 열은 분화 유도된 세포의 결과를 나타낸 것이며, 여기서 상기 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

도 14는 실시예 3에서 신경능선 세포와 후장 세포를 3차원으로 8일간 공배양한 뒤 얻어진 세포에서 NDRG4의 발현 수준의 변화를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 14의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 대조군을 나타내고, 오른쪽 열은 분화 유도된 세포의 결과를 나타낸 것이며, 여기서 상기 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

도 15는 실시예 3에서 신경능선 세포와 후장 세포를 3차원 공배양 개시 후 24 시간, 48 시간 및 96 시간 경과하였을 때 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다. 이때 대조군으로는 신경능선 세포만을 단독으로 3차원 배양한 사진을 나타내었다.

도 16은 실시예 4에서 신경능선 세포와 후장 세포를 3차원 공배양 시 BMP 억제제인 LDN-193189를 추가로 첨가한 후 8일간 공배양한 뒤 얻어진 세포에서 LMX1A, NDRG4, PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 16의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 LDN-193189을 첨가한 경우이고, 오른쪽 열은 첨가하지 않은 경우이다.

도 17은 실시예 4에서 신경능선 세포와 후장 세포를 3차원 공배양 시 BMP 억제제인 LDN-193189를 추가로 첨가한 후 8일간 공배양한 뒤 얻어진 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 18은 실시예 5에서 외배엽성 세포로부터 8일간 분화를 유도 후 얻어진 신경능선 세포와 후장 세포를 3차원 공배양 개시 후 8일이 경과하였을 때 LMX1A, NDRG4, PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 18의 각 마커별 그래프에 있어서, 왼쪽 열은 8일간 분화 유도하여 얻어진 신경능선 세포를 사용한 경우이고, 오른쪽 열은 4일간 분화 유도하여 얻어진 신경능선 세포를 사용한 경우이다.

도 19는 실시예 6에서 장 신경계의 성숙 과정을 위한 실험 설계도를 나타낸 것이다.

도 20은 실시예 6에서 장 신경계를 계대 배양한 후 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것으로, 도 20의 (a)는 상기 계대 배양 시 SHH를 처리하지 않은 대조군의 사진이고, (b)는 SHH를 처리한 경우이다.

도 21은 실시예 6에서 장 신경계를 계대 배양한 후 NDRG4, PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 도 21의 각 마커별 그래프에서 왼쪽 열은 SHH를 처리하지 않은 대조군의 결과이고, 오른쪽 열은 SHH를 처리한 경우이다.

도 22는 실시예 6에서 장 신경계를 계대 배양한 후 뉴런의 마커인 TUJ1 면역 형광 염색 후 현미경 촬영한 사진을 나타낸 것이다. 이때 파란색은 세포 핵이고, 빨간색으로 염색된 부분이 뉴런(TUJ1)에 해당한다.

도 23은 실시예 6에서 장 신경계를 계대 배양한 후 TUJ1의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 이때 대조군으로는 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 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.

[0080] **실시예**

[0082] 세포주의 준비 및 유지

[0083] 이하의 실험에서는 인간 배아 줄기세포를 사용하였고, 배지는 Stemfit 배지로 이틀에 한번씩 교체해 주었다. 단, 상기 Stemfit 배지로는 b-FGF(20ng/ml)를 포함하는 것을 사용하였다. 세포는 5% CO_2 및 37℃의 온도 조건하에서 배양하였고, 세포를 7일 이내로 계대 배양하였다.

[0085] [실시예 1] 후장 세포로의 분화 유도

[0086] 1. 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화 유도

[0087] 도 1은 상기 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도로, 상기 도 1에서 보는 바와 같이 액티빈 A(100ng/ml) 및 CHIR-99021(3um)를 첨가한 RPMI1640 배지에 인간 배아 줄기세포를 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.

[0088] 3일 경과 후 내배엽성 세포로의 분화가 유도되었는지 확인하기 위하여 하기 표 1의 프라이머를 통해 qRT-PCR로 다능성 관련 마커인 OCT4 및 NANOG와 내배엽성 관련 마커인 SOX17 및 FOXA2의 발현 수준의 변화를 확인하여 그 결과를 도 2에 나타내었다. 단, 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

[0089] 도 2에서 보는 바와 같이, 3일간 분화 유도 후 다능성 줄기세포 마커인 OCT4 및 NANOG의 발현 수준은 감소하였지만, 내배엽성 마커인 SOX17 및 FOXA2의 발현 수준은 현저히 증가하였는 바, 인간 배아 줄기세포로부터 내배엽성 세포로의 분화가 안정적으로 유도되었음을 확인할 수 있었다.

표 1

[0090]

유전자	정방향	역방향
SOX17	5'-CAGGCCTGCAGCGCCATGAGCAGCCCG-3'	5'-CTGGGGCGGATCCGGGACCTGTCACAC-3'
FOXA2	5' -CTTCAAGCACCTGCAGATTC-3'	5' -AGACCTGGATTTCACCGTGT-3'
OCT4	5' -GGGGTTCTATTTGGGAAGGTAT-3'	5' -TGTTGTCAGCTTCCTCCACC-3'
NANOG	5' -CAGAAGGCCTCAGCACCTAC-3'	5' -ATTGGAAGGTTCCCAGTCGG-3'

[0092] 2. 내배엽성 세포로부터 후장 세포로의 분화 유도

[0093] 도 3은 상기 내배엽성 세포로부터 후장 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도로, 상기 도 3에서 보는 바와 같이 FBS 2 중량%, FGF4(500ug/ml) 및 CHIR-99021(3um)를 첨가한 DMEM F-12 배지에 상기 내배엽성 세포를 접종한 뒤 4일 동안 분화를 유도하였다. 분화 개시 후 2일, 3일 및 4일 경과 후 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 도 4의 A, B 및 C로 나타내었고, 4일 경과 후 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 통해 후장 마커인 KLF5, CDX1 및 CDX2의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다. 대조군으로는 인간 배아 줄기세포를 사용하였다.

[0094] 도 4에서 보는 바와 같이, 분화 유도 기간이 도과하자 스페로이드(spheroids) 형상의 후장 세포가 얻어졌고, 웰당 30개의 스페로이드가 형성되었다. 또한 도 5 및 6에서 보는 바와 같이, 3일간 분화 유도 후 후장 마커인 KLF5, CDX1 및 CDX2의 발현 수준이 현저히 증가하였는 바, 내배엽성 세포로부터 후장 세포로 안정적으로 분화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.

표 2

[0095]

유전자	정방향	역방향
KLF5	5' -GGTTGCACAAAAGTTTATAC-3'	5' -GGCTTGGCGCCCGTGTGCTTCC-3'
CDX1	5' -AGGACAAGTACCGCGTGGTCTA-3'	5' -CCTCTGAACGTATGGAGGAGG A-3'
CDX2	5'- ACACCTTCTACAATGAGC-3'	5'- ACGTCACACTTCATGATG-3'

[0097] [실시예 2] 신경능선 세포로의 분화 유도

[0098] 1. 줄기세포로부터 외배엽성 세포로의 분화 유도

[0099] 도 7은 상기 인간 배아 줄기세포로부터 외배엽성 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도로, 상기 도 8에서 보는 바와 같이 10% 넉아웃 혈청 대체제(Knock out serum replacement)를 포함하는 DMEM F-12 배지에 인간 배아 줄기세포를 접종 및 배양하였다. LDN(100nm), SB431542 및 CHIR99021을 2일간 처리하였다.

[0100] 2일 경과 후 외배엽성 세포로의 분화가 유도되었는지 확인하기 위하여 하기 표 3의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 통해 외배엽성 관련 마커인 NESTIN 및 OTX2의 발현 수준의 변화를 확인하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 단, 대조군은 인간 배아 줄기세포에 해당한다.

[0101] 도 9에서 보는 바와 같이, 2일간 분화 유도 후 외배엽성 마커인 NESTIN 및 OTX2의 발현 수준은 현저히 증가하였는 바, 인간 배아 줄기세포로부터 외배엽성 세포로의 분화가 안정적으로 유도되었음을 확인할 수 있었다.

표 3

[0102]

유전자	정방향	역방향
NESTIN	5'-ATAGAGGGCAAAGTGGTAAGCAG-3'	5'-TTCTAGTGTCTCATGGCTCTGGTT-3'
OTX2	5'-GACCACTTCGGGTATGGACT-3'	5'-TGGACAAGGGATCTGACAGT-3'

[0104] 2. 외배엽성 세포로부터 신경능선 세포로의 분화 유도

[0105] 도 9는 상기 외배엽성 세포로부터 신경능선 세포로의 분화를 유도하기 위한 실험 설계도로, 상기 도 9에서 보는 바와 같이 넉아웃 혈청 대체제(Knock out serum replacement)나 소혈청을 포함하지 않는 DMEM F-12 배지에 상기 외배엽성 세포를 접종 및 배양하였다. 이때 SB431542(10um) 및 CHIR99021(3um)을 4일간 처리하였다. 분화 개시 후 4일이 경과하였을 때 하기 표 4의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 통해 신경능선 세포의 초기 마커인 ZIC1과, 성숙기 마커인 SOX10 및 FOXD3의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 10에 나타내었다. 대조군으로는 인간 배아 줄기세포를 사용하였다. 또한, 분화 개시 후 4일 째에 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 도 11에 나타내었다.

[0106] 도 10에서 보는 바와 같이, 4일간 분화 유도 후 신경능선 세포의 초기 마커인 ZIC1과, 성숙기 마커인 SOX10 및 FOXD3의 발현 수준이 현저히 증가하였고, 도 11에서 보는 바와 같이 신경능선 세포의 형상을 확인할 수 있었으므로, 외배엽성 세포로부터 신경능선 세포로 안정적으로 분화가 유도되었음을 확인할 수 있었다.

표 4

[0107]

유전자	정방향	역방향
ZIC1	5'-GTCCTACACGCATCCCAGTT-3'	5'-GCGATAAGGAGCTTGTGGTC-3'
SOX10	5'-CTCACTGCCCTGATGACCCA-3'	5'-CAGCCCCTCATCTTTCAGTGT-3'
FOXD3	5'-GACATGTTCGACAACGGCAG-3'	5'-CTGTAAGCGCCGAAGCTCTG-3'

[0109] [실시예 3] 신경능선 세포와 후장 세포의 공배양을 통한 장 신경계(ENS)의 유도

[0110] 도 12는 상기 신경능선 세포와 후장 세포의 공배양을 통해 장 신경계를 유도하기 위한 실험 설계도로, 상기 도 12에서 보는 바와 같이 2% FBS를 포함하는 DMEM F-12 배지에 보충제로 N2 및 B27을 첨가하고, 신경능선 세포와 후장 세포를 3차원으로 총 8일 동안 공배양하였다. 이때 BMP4(10ng/ml) 및 EGF(100ng/ml)을 3일 동안 처리하고, 그후 EGF(100ng/ml)만을 1일 동안 처리한 뒤, 신선한 배지로 교체하여 주며 BMP4(10ng/ml)를 4일 동안 처리하였다. 총 8일이 경과하면, 장 신경계가 유도가 되었는 지 확인하기 위하여, 하기 표 5의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 통해 장크롬친화세포(enterochromaffin cell)의 마커인 LMX1A와, 자율신경세포(autonomic neuron) 마커인 PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 13에 나타내고, 장 신경계 마커인 NDRG4(N-myc Down stream-Regulated Gene4)의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 이때 대조군으로는 인간 배아 줄기세포를 사용하였다. 또한, 공배양 시작 후 24 시간, 48 시간, 및 96 시간이 경과하였을 때에 현미경으로 관찰한 세포 사진을 도 14에 나타내었고, 대조군으로는 신경능선 세포만을 단독으로 3차원 배양한 사진을 나

타내었다.

[0111] 도 13 및 14에서 보는 바와 같이, 상기 신경능선 세포와 후장 세포의 3차원 공배양을 통해 뉴런의 발달과 관련된 세로토닌을 분비하는 것으로 알려진 장크롬친화세포의 마커인 LMX1A의 발현 수준이 현저히 증가하였고, 자율신경세포의 마커인 PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준 또한 현저히 증가하였으며, 장 신경계 마커인 NDRG4의 발현 수준 또한 매우 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그 외에도 도 15에서 보는 바와 같이, 신경능선 세포와 후장 세포의 3차원 공배양 개시 후 96 시간이 경과하였을 때에 대장과 장 신경계가 결합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 신경능선 세포만을 단독으로 3차원 배양한 경우에는 장 신경계의 형상을 관찰할 수 없었다.

표 5

[0112]

유전자	정방향	역방향
LMX1A	5’ -TCAGAAGGGTGATGAGTTTGTCC-3’	5’ -GGGGCGCTTATGGTCCTTG-3’
PHOX2B	5'-CCAGTGCCAGCCCAATAGAC-3’	5'-TGGACAATAGCAAAGCGGTTG-3’
GATA3	5'-TGTCTGCAGCCAGGAGAGC-3’	5'-ATGCATCAAACAACTGTGGCCA-3’
NDRG4	5'-ATGCTTTCCATCCACTCACC-3’	5'-TTCACTGCTCTCTCCCGTTT-3’

[0114] [실시예 4] 장 신경계(ENS)의 유도에 있어 BMP 신호의 역할 규명

[0115] 장 신경계의 유도에 있어 BMP 신호가 중요한 역할을 하는 지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 공배양 시 BMP 억제제인 LDN-193189 (LDN)을 추가로 첨가하였다. 신경능선 세포와 후장 세포의 3차원 공배양 후 총 8일이 경과하였을 때 qRT-PCR을 이용하여 LMX1A, NDRG4, PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 16에 나타내었다. 이때 각 마커의 발현 그래프에 있어서, 왼쪽 열은 LDN-193189을 첨가한 경우이고, 오른쪽 열은 첨가하지 않은 경우이다. 또한, 8일 경과 후 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 도 17에 나타내었다.

[0116] 도 16에서 보는 바와 같이, 신경능선 세포와 후장 세포의 3차원 공배양 시 BMP 억제제를 첨가하자 첨가하지 않은 경우와 비교하여 LMX1A, NDRG4, PHOX2B 및 GATA3이 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 17에서 보는 바와 같이 BMP 억제제를 첨가한 경우는 현미경 사진으로도 장 신경계가 유도되지 않았음을 확인할 수 있었다.

[0117] 이를 통하여 BMP 신호가 장 신경계로의 분화 유도에 중요한 역할을 수행하는 것임을 알 수 있었다.

[0119] [실시예 5] 장 신경계(ENS)의 유도에 있어 신경능선 세포의 분화 기간의 영향

[0120] 장 신경계의 유도에 있어 공배양에 사용하는 신경능선 세포의 분화 기간의 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 공배양 시 사용한 신경능선 세포로는 상기 실시예 2의 2.에서 8일간 분화를 유도한 것을 사용하였다. 이렇게 신경능선 세포와 후장 세포의 3차원 공배양 후 총 8일이 경과하였을 때 qRT-PCR을 이용하여 LMX1A, NDRG4, PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 18에 나타내었다. 이때 각 마커의 발현 그래프에 있어서, 왼쪽 열은 공배양 시 8일간 분화 유도하여 얻어진 신경능선 세포를 사용한 경우이고, 오른쪽 열은 4일간 분화 유도하여 얻어진 신경능선 세포를 사용한 경우이다.

[0121] 도 18에서 보는 바와 같이, 8일간 분화 유도된 신경능선 세포를 사용한 경우는 4일간 분화 유도된 신경능선 세포를 사용한 경우와 달리 후장 세포와 공배양 후 LMX1A, NDRG4, PHOX2B 및 GATA3이 거의 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었는 바, 장 신경계로의 분화가 유도되지 않았음을 알 수 있었다.

[0122] 이를 통하여 신경능선 세포의 분화 유도 기간이 그후 이어질 장 신경계로의 분화 유도에 중요한 역할을 수행하는 것임을 알 수 있었다.

[0124] [실시예 6] 장 신경계(ENS)의 성숙 과정

[0125] 장관 오가노이드의 제작을 위해서는 유도된 장 신경계(ENS)의 성숙 과정이 요구된다. 이에 따라 도 19에 나타낸 유도된 장 신경계의 성숙 과정을 위한 실험 설계도에 따라, 상기 실시예 3에서 3차원 공배양 개시 후 대략 10일이 경과하였을 때 얻어진 장 신경계를 2% FBS, 보충제로 N2 및 B27을 포함하는 DMEM F-12 배지에서 계대 배양하되, 상기 배지에 BMP4(10ng/ml) 및 SHH(20ng/ml)를 처리하였다. 7일간 계대 배양 후 현미경으로 관찰한 세포 사진을 도 20에 나타내었고, qRT-PCR을 이용하여 NDRG4, PHOX2B 및 GATA3의 발현 수준을 측정해 그 결과를 도 21에 나타내었다. 단, 이때 대조군으로는 계대 배양 시 SHH를 처리하지 않았다. 도 20의 (a)는 SHH를 처리하지 않

은 경우이고, (b)는 SHH를 처리한 경우이며, 도 21에서 각 마커에 대한 그래프에 있어서 왼쪽 열은 SHH를 처리하지 않은 경우이고, 오른쪽 열은 SHH를 처리한 경우이다.

[0126] 도 20의 (b)에서 보는 바와 같이 상기 장 신경계의 계대 배양 시 SHH를 처리한 경우 장 신경계가 잘 발달된 것을 볼 수 있지만, 도 20의 (a)에서 보는 바와 같이, 상기 장 신경계의 계대 배양 시 SHH를 첨가하지 않는 경우 장 신경계가 발달하지 않은 것을 볼 수 있다.

[0127] 도 21에서 보는 바와 같이, 장 신경계의 계대 배양 시 SHH를 첨가하지 않는 경우 NDRG4, PHOX2B 및 GATA3이 거의 발현되지 않았지만, SHH를 첨가한 경우 NDRG4, PHOX2B 및 GATA3가 현저히 높은 수준으로 발현되었는 바, 장 신경계의 유지를 위한 장기 계대 배양 시 헤지호그 신호가 중요한 역할을 수행하는 것임을 알 수 있었다.

[0128] 또한, 상기와 같이 성숙된 장 신경계에서 뉴런의 마커인 TUJ1을 면역 형광 염색하였다. 구체적으로는 상기 장 신경계의 계대 배양 후 4% PFA로 고정한 뒤, PBS에서 0.5% BSAin 0.5% Triton X100을 이용하여 세척 후 투과(permeabilization)시킨 후 β3 Tubulin 항체(sc-51670, Santacruz)를 이용하여 블러킹(blocking)하며 4℃에서 밤새 배양한 뒤 2차 항체를 추가하여 역시 4℃에서 밤새 배양하였다. 이후 현미경으로 촬영한 사진을 도 22에 나타내고, 하기 표 6의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 이용해 TUJ1의 발현 수준을 측정해 그 결과를 도 23에 나타내었다. 단 이때 대조군으로는 인간 배아 줄기세포를 사용하였다.

표 6

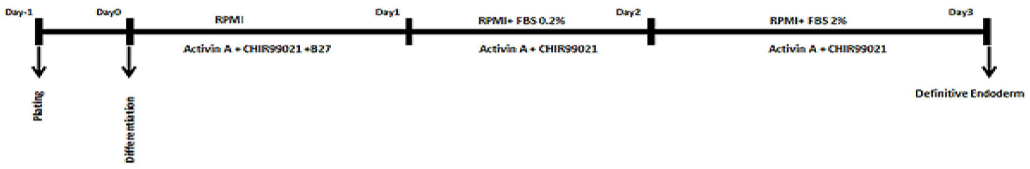
[0129]

유전자	정방향	역방향
TUJ1	5’ - GAGGGAGATCGTGCACATCCAGG-3’	5’ - CGAGTCGCCCACGTAGTTGC-3’

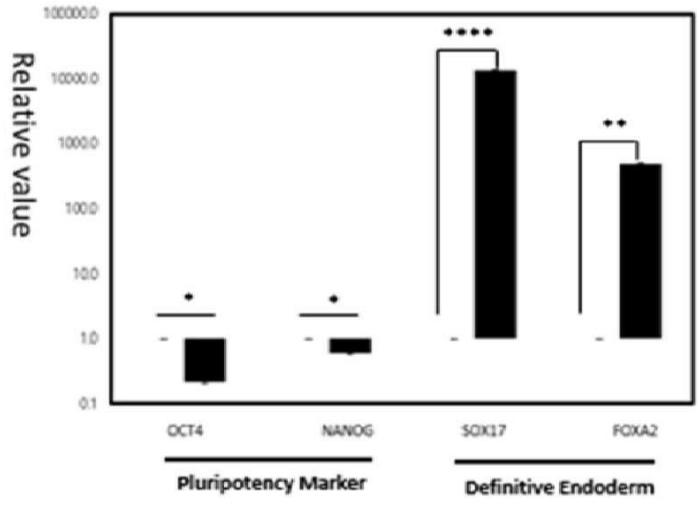
[0130] 도 22 및 23에서 보는 바와 같이, SHH의 존재 하에서 장 신경계의 계대 배양으로 인하여 뉴런의 마커인 TUJ1가 잘 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

도면

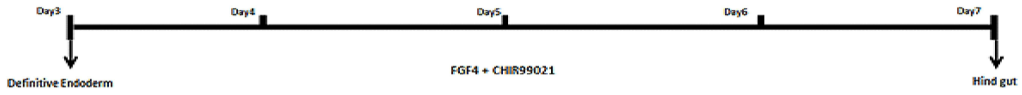
도면1



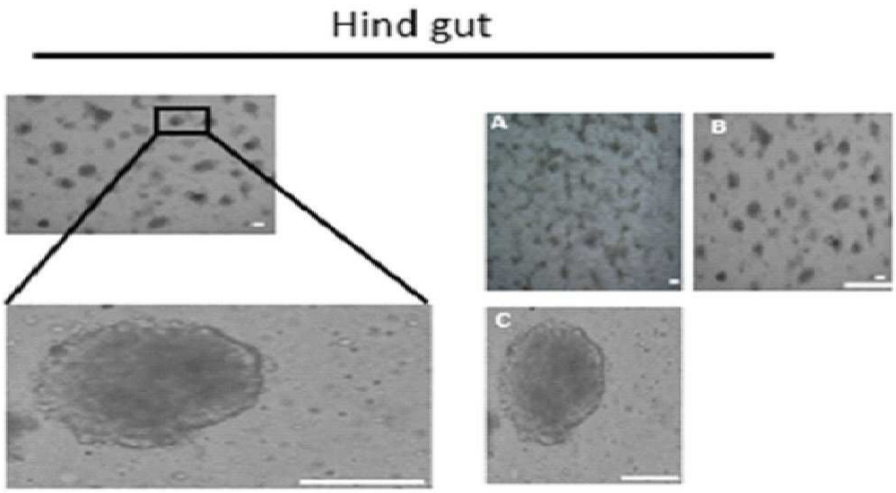
도면2



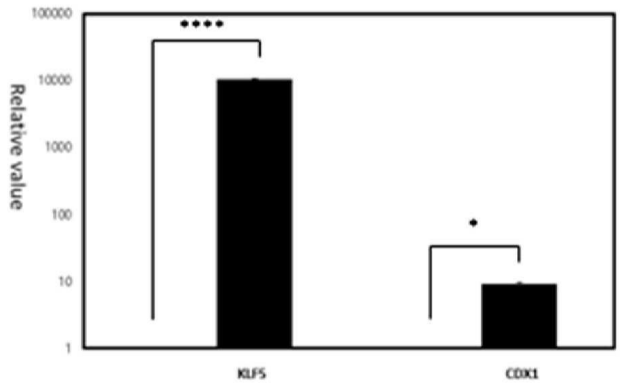
도면3


Day3
Day4
Day5
Day6
Day7
Definitive Endoderm
FGF4 + CHIR99021
Hind gut

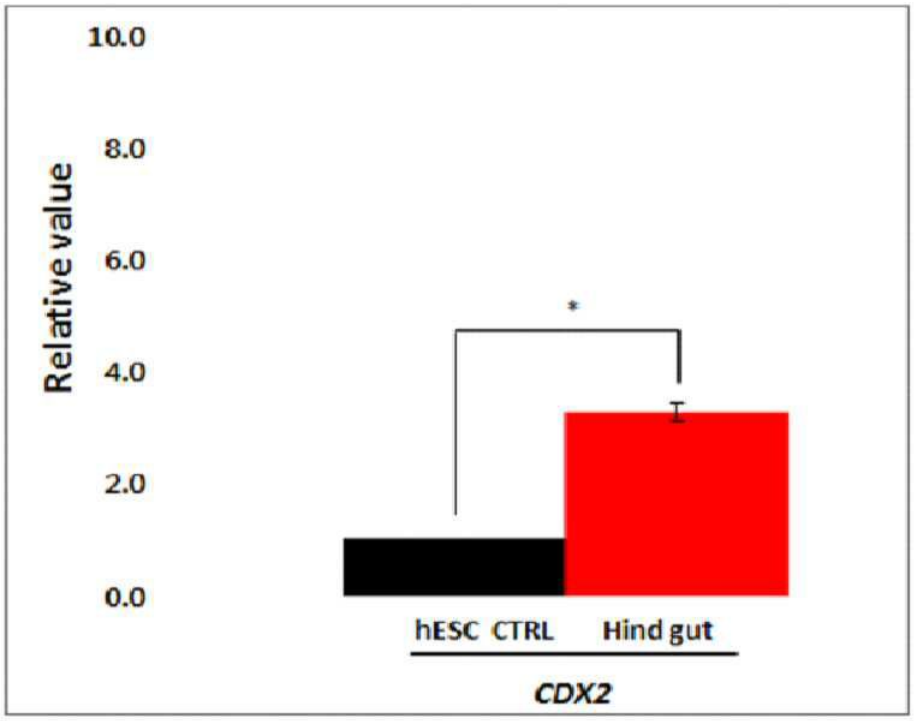
도면4


Hind gut
A
B
C

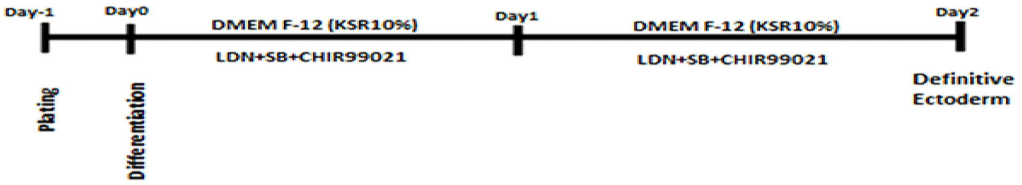
도면5


100000
10000
1000
100
10
1
Relative value
KLF5
CDX1

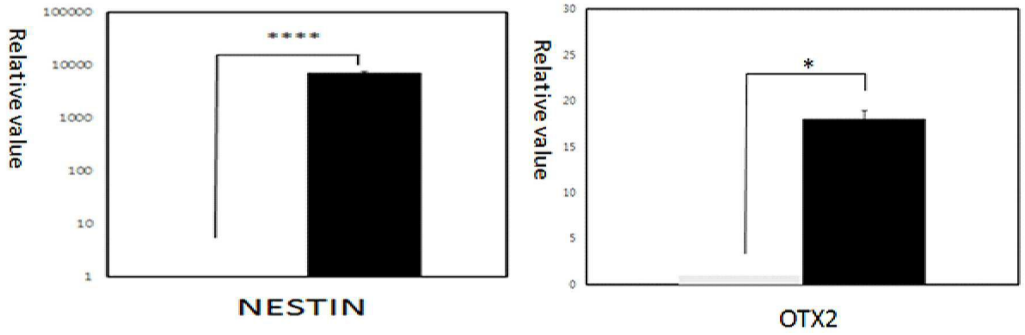
도면6



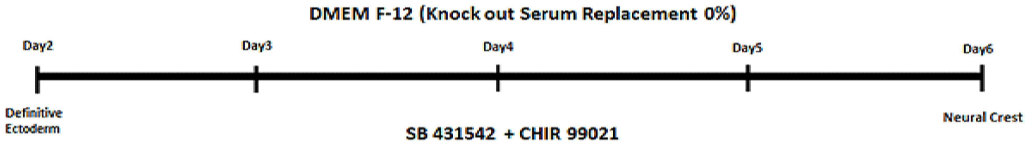
도면7



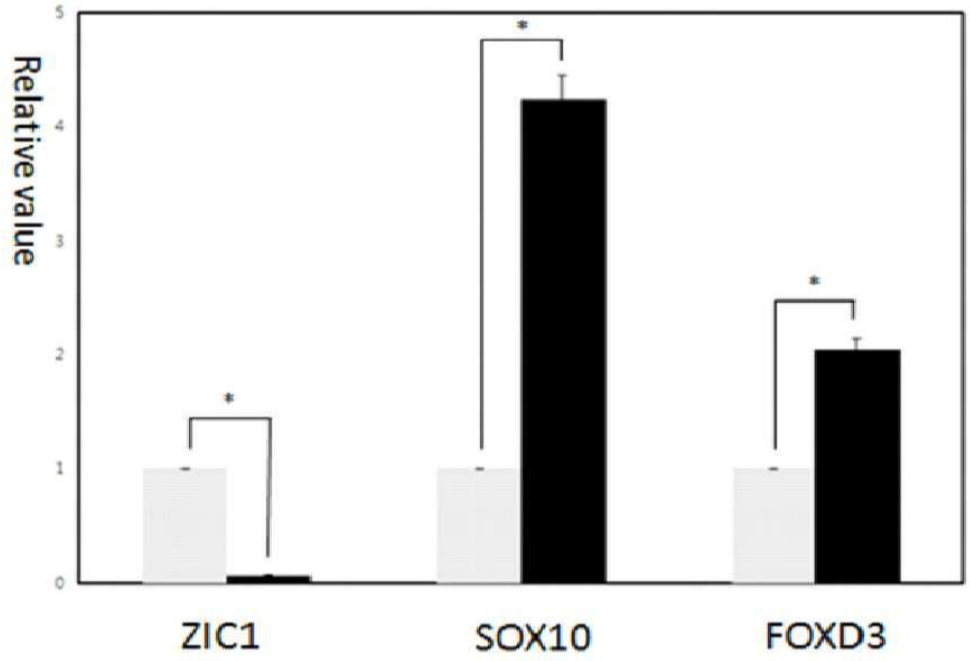
도면8



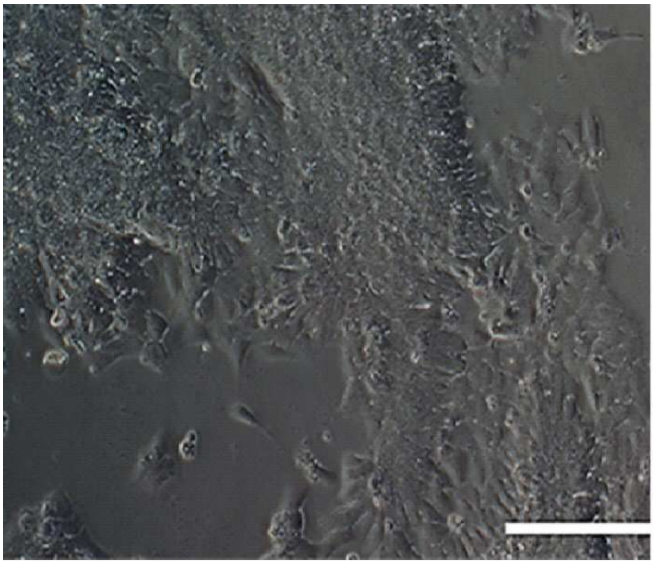
도면9



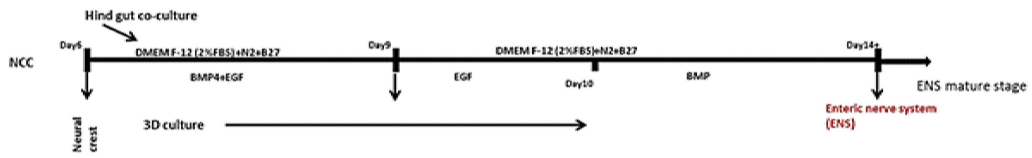
도면10



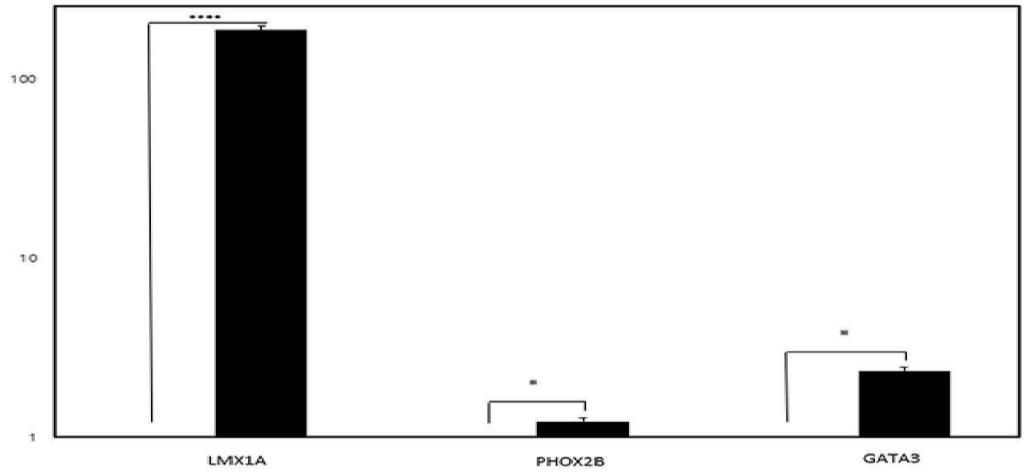
도면11



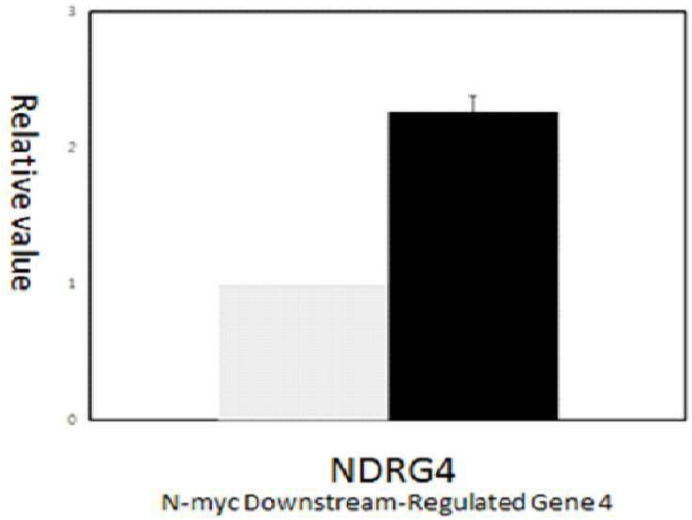
도면12



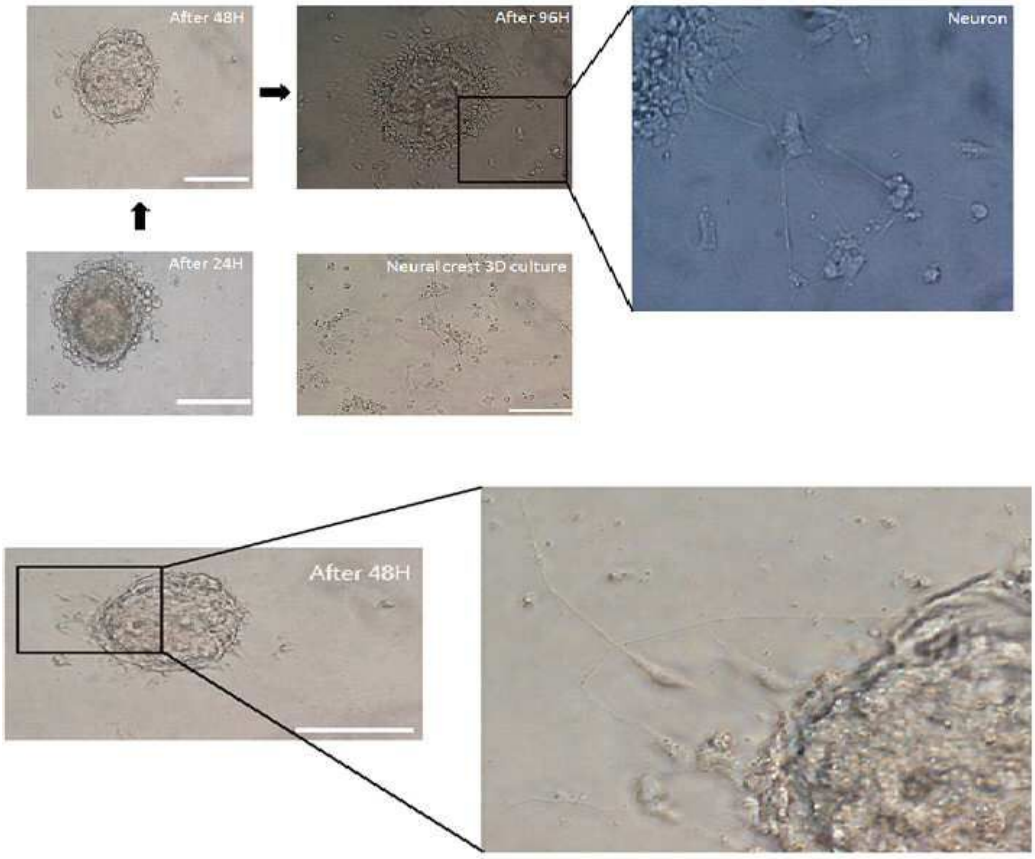
도면13


100
10
1
LMX1A
PHOX2B
GATA3

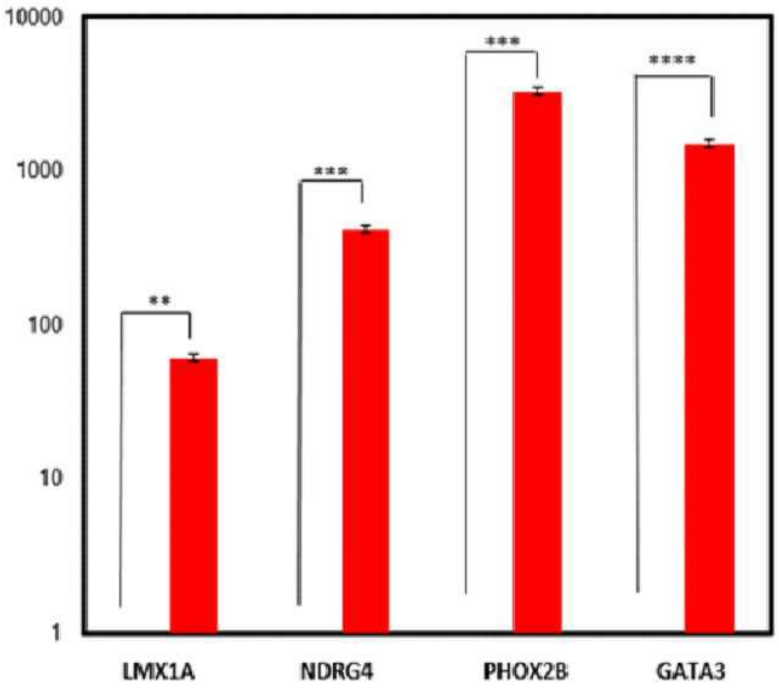
도면14


Relative value
3
2
1
0
NDRG4
N-myc Downstream-Regulated Gene 4

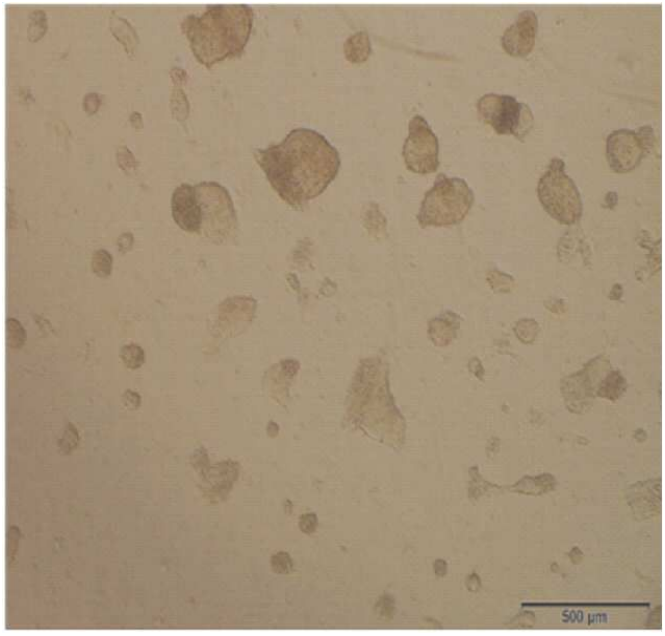
도면15


After 48H
After 96H
Neuron
After 24H
Neural crest 3D culture
After 48H

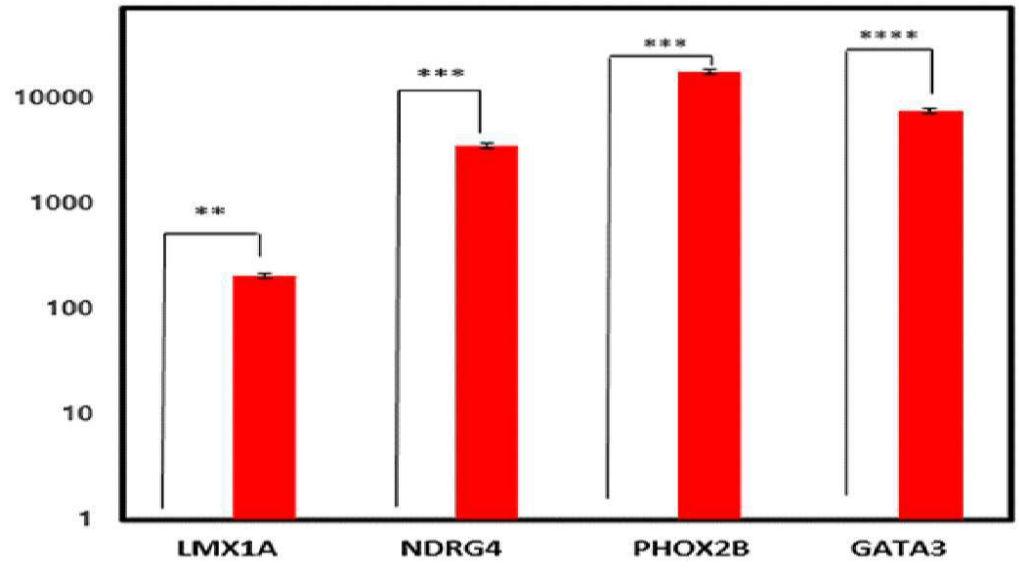
도면16


10000
1000
100
10
1
**
***
***
****
LMX1A
NDRG4
PHOX2B
GATA3

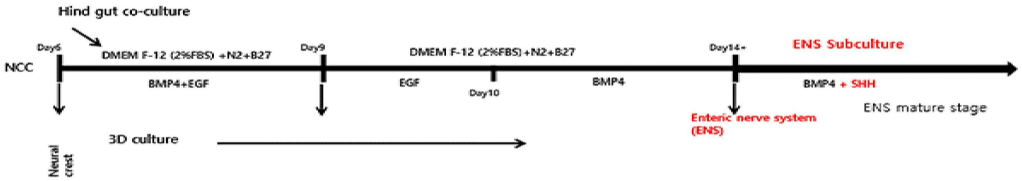
도면17



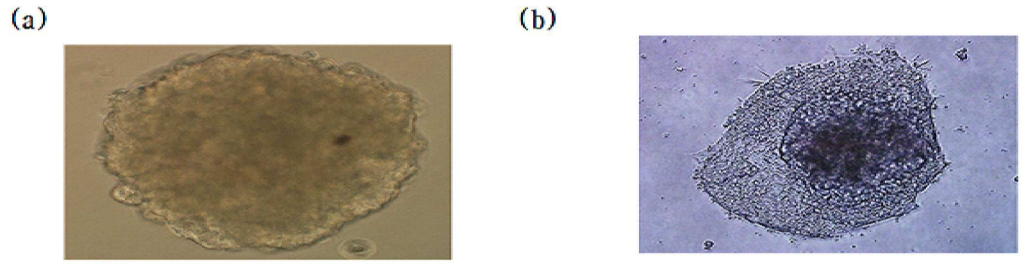
도면18



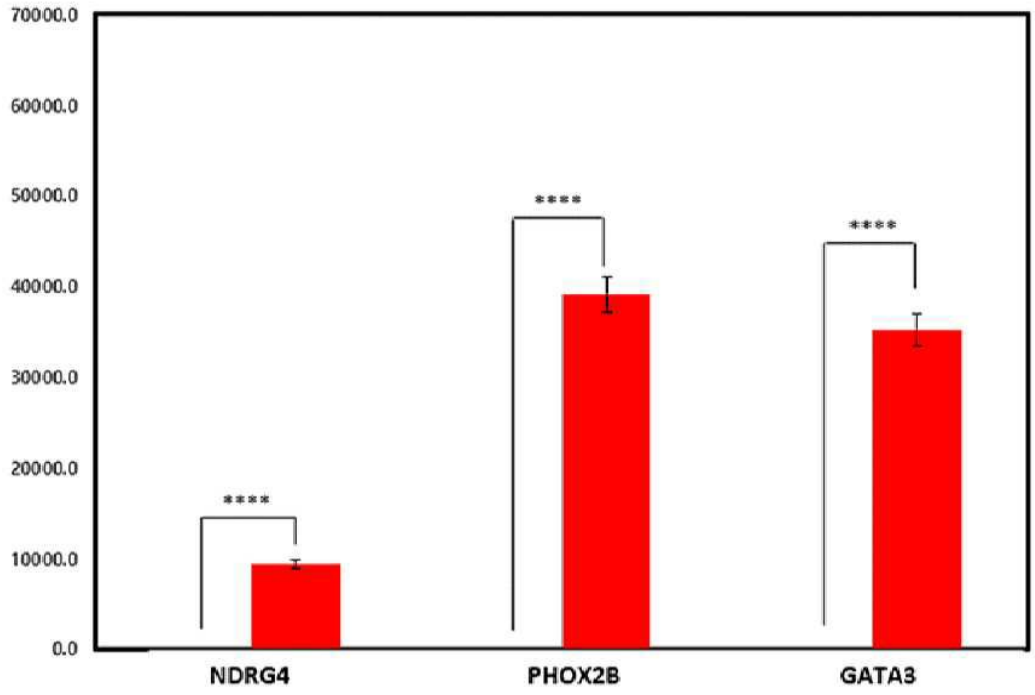
도면19



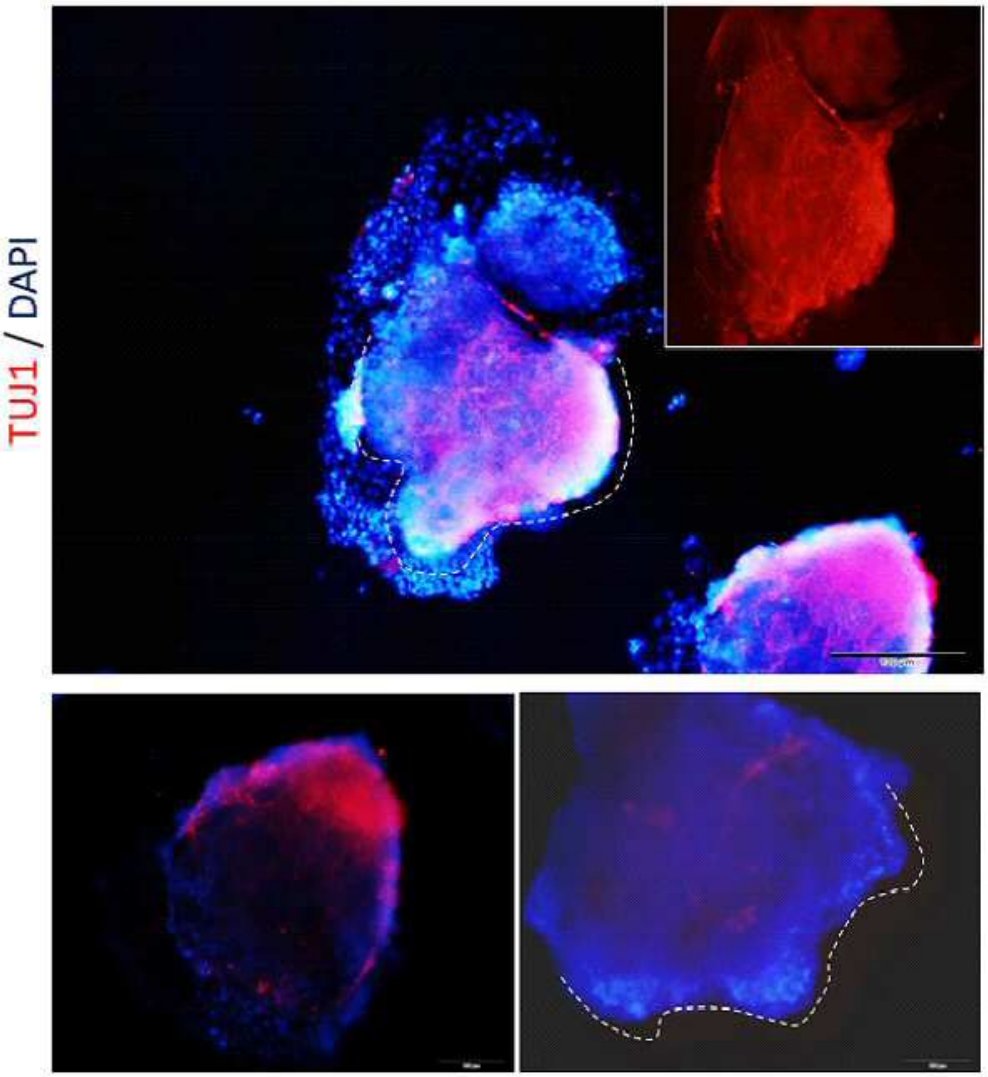
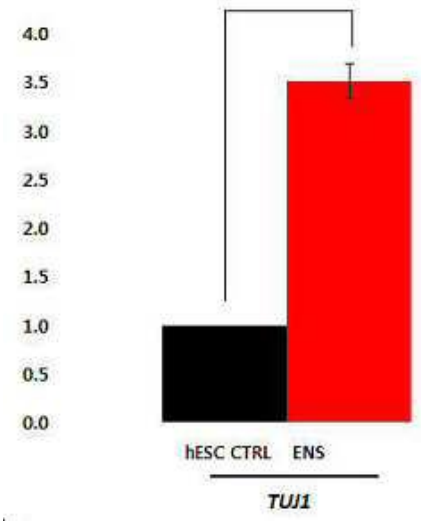
도면20


(a)
(b)

도면21


70000.0
60000.0
50000.0
40000.0
30000.0
20000.0
10000.0
0.0
****
****
****
NDRG4
PHOX2B
GATA3

도면22



도면23