(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0050670
(43) 공개일자 2022년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) *C12N 5/071* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0618 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0134618
(22) 출원일자 2020년10월16일
심사청구일자 2020년10월16일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
주식회사 유니언스진
서울특별시 송파구 양재대로60길 3-13 ,9층(가락동,가락동문산부인과)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35 용산시티파크1단지 103동 603호
박수정
서울특별시 서대문구 성산로24길 1-14 201호
이상남
서울특별시 송파구 송파대로28길 24 밀리아나2차 오피스텔 819호
(74) 대리인
김현진

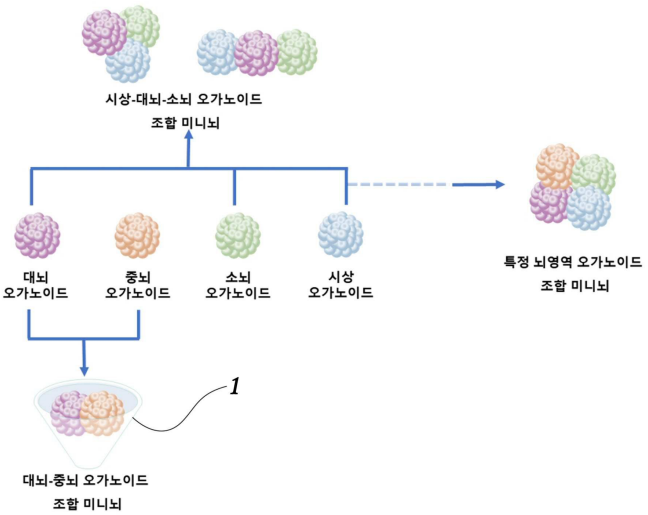
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **미니뇌 구조체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 미니뇌 구조체 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 유도만능줄기세포를 이용하여 대뇌, 중뇌, 소뇌, 시상 등 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 제작하고 이들을 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써 더욱 효과적으로 실제 뇌기능을 구현하는 것이 가능하며, 목적에 따라 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 선별적으로 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써 뇌오가노이드 이용의 목적을 달성하면서도 편리성 및 경제성을 향상시킬 수 있는 미니뇌 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/91 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)
C12N 2533/90 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

복수 개의 뇌 오가노이드들을 포함하며,

상기 복수 개의 뇌 오가노이드들 각각은 다른 뇌 영역의 오가노이드이고,

상기 복수 개의 뇌 오가노이드들은 결합되어 하나의 조직을 이루는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미니뇌 구조체는 그 사용 목적에 따라, 취사 선택된 오가노이드들이 결합되어 형성되는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미니뇌 구조체는 그 사용 목적에 따라, 오가노이드들의 결합 위치를 달리하여, 다른 형태를 가지는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체.

청구항 4

미니뇌 구조체의 이용 목적에 따라, 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들을 취사 선택하는 선별단계와; 상기 선별단계에서 취사 선택된 오가노이드들 각각이 부유되어 있는 배지들을 균질화시키는 배지조성조절단계와; 상기 배지조성조절단계 후 배지들을 하나의 용기에 혼합하여 각각의 오가노이드들을 인접시키는 혼합단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 미니뇌 구조체의 제조방법은 상기 혼합단계 후 각 오가노이드들의 결합을 유도하는 결합 유도 물질을 혼합된 배지에 추가한 후 배양하여 각 오가노이드들이 결합되어 하나의 조직을 이루도록 하는 결합유도단계;를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드는 특이적 배지를 이용하여 유도만능줄기세포의 분화를 유도하여 형성되며, 특이적 배지에 부유 상태로 자라는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 배지조성조절단계에서는 일 오가노이드가 부유되어 있는 배지에, 동일량의 타 오가노이드용 배지들을 일정 기간에 걸쳐 점진적으로 혼합하여 수행되는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체의 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 혼합단계에서는 혼합된 배지에서 각 오가노이드들의 인접을 용이하게 하고, 인접되는 위치를 조절하기 위

한 오가노이드 배치용 용기가 사용되는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체의 제조방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 결합유도물질로는 메트리겔, 콜라겐, 젤라틴 및 동물의 뇌조직에서 추출한 뇌의 세포외기질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상이 사용되는 것을 특징으로 하는 미니뇌 구조체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미니뇌 구조체 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 유도만능줄기세포를 이용하여 대뇌, 중뇌, 소뇌, 시상 등 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 제작하고 이들을 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써 더욱 효과적으로 실제 뇌기능을 구현하는 것이 가능하며, 목적에 따라 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 선별적으로 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써 뇌 오가노이드 이용의 목적을 달성하면서도 편리성 및 경제성을 향상시킬 수 있는 미니뇌 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오가노이드(organoid)는 줄기세포나 장기에서 분리한 세포를 3D 배양을 통해 재응집·재조합하여 만든 유사 장기체로, 이를 이용하여 장기의 구조와 기능을 재현하는 것이 가능하여, 신약 개발 및 질병 치료 등에 상기 오가노이드를 이용하고자 하는 연구가 널리 이루어지고 있다.

[0003] 상기 오가노이드 중 최근 주목받고 있는 것이 뇌 오가노이드인데, 뇌 오가노이드는 뇌의 특이적 세포를 포함하고 뇌가 지닌 특정 기능을 재현할 수 있다. 상기 뇌 오가노이드는 하기 특허문헌에 기재된 바와 같이 유도만능줄기세로를 신호전달물질이 함유된 배지와 생체 기질 환경에서 배양하여, 자가 조직화, 자가 증식, 조직 특이적 계통 분화를 통해 제조되게 되는데, 현재 뇌의 특정 영역, 중뇌, 소뇌, 시상, 시상하부 등과 유사한 뇌 오가노이드를 제작하는 방법이 알려져 있다.

[0004] <특허문헌>

[0005] 특허공개공보 제10-2020-0081294호(2020. 07. 07. 공개) "뇌 오가노이드 제작방법"

[0006] 하지만, 종래의 단편적인 특정 영역의 뇌 오가노이드만으로는, 복잡하고 유기적인 연결로 결합되어 있는 인체의 뇌기능을 구현하기가 어려운 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,

[0008] 본 발명은 유도만능줄기세포를 이용하여 대뇌, 중뇌, 소뇌, 시상 등 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 제작하고, 이들을 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써, 더욱 효과적으로 실제 뇌기능을 구현하는 것이 가능한 미니뇌 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 목적에 따라 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 선별적으로 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써, 뇌오가노이드 이용의 목적을 달성하면서도 편리성 및 경제성을 향상시킬 수 있는 미니뇌 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발병은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체는 복수 개의 뇌 오가노이드들을 포함하며, 상기 복수 개의 뇌 오가노이드들 각각은 다른 뇌 영역의 오가노이드이고, 상기 복수 개의 뇌 오가노이드들은 결합되어 하나의 조직을 이루는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체는 그 사용 목적에 따라, 취사 선택된 오가노이드들이 결합되어 형성되는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체는 그 사용 목적에 따라, 오가노이드들의 결합 위치를 달리하여, 다른 형태를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체의 제조방법은 미니뇌 구조체의 이용 목적에 따라, 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들을 취사 선택하는 선별단계와; 상기 선별단계에서 취사 선택된 오가노이드들 각각이 부유되어 있는 배지들을 균질화시키는 배지조성조절단계와; 상기 배지조성조절단계 후 배지들을 하나의 용기에 혼합하여 각각의 오가노이드들을 인접시키는 혼합단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체의 제조방법은 상기 혼합단계 후 각 오가노이드들의 결합을 유도하는 결합 유도 물질을 혼합된 배지에 추가한 후 배양하여 각 오가노이드들이 결합되어 하나의 조직을 이루도록 하는 결합유도단계;를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체의 제조방법에 있어서 상기 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드는 특이적 배지를 이용하여 유도만능줄기세포의 분화를 유도하여 형성되며, 특이적 배지에 부유상태로 자라는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체의 제조방법에 있어서 상기 배지조성조절단계에서는 일 오가노이드가 부유되어 있는 배지에, 동일량의 타 오가노이드용 배지들을 일정 기간에 걸쳐 점진적으로 혼합하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체의 제조방법에 있어서 상기 혼합단계에서는 혼합된 배지에서 각 오가노이드들의 인접을 용이하게 하고, 인접되는 위치를 조절하기 위한 오가노이드 배치용 용기가 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 미니뇌 구조체의 제조방법에 있어서 상기 결합유도물질로는 메트리겔, 콜라겐, 젤라틴 및 동물의 뇌조직에서 추출한 뇌의 세포외기질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상이 사용되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.

[0021] 본 발명은 유도만능줄기세포를 이용하여 대뇌, 중뇌, 소뇌, 시상 등 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 제작하고, 이들을 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써, 더욱 효과적으로 실제 뇌기능을 구현하는 것이 가능한 효과가 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 목적에 따라 각기 다른 영역의 뇌 오가노이드를 선별적으로 결합시켜 하나의 조직체를 형성함으로써, 뇌오가노이드 이용의 목적을 달성하면서도 편리성 및 경제성을 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미니뇌 구조체의 제조과정을 설명하기 위한 참고도.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 미니뇌 구조체의 제조에 이용되는 특정 뇌영역 오가노이드의 분화 여부를 확인하기 위한 공초점 현미경 이미지.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 미니뇌 구조체의 제조에 이용되는 특정 뇌영역 오가노이드에 대해 MEA를 이용하여 전기신호를 측정한 결과를 나타내는 도면.

도 4 및 5는 본 발명의 일 실시예 따른 미니뇌 구조체의 제조과정을 설명하기 위한 사진.

도 6은 본 발명의 일 실시예 따른 미니뇌 구조체의 제조과정을 설명하기 위한 현미경 이미지.

도 7은 본 발명의 다른 실시예 따른 미니뇌 구조체의 제조과정을 설명하기 위한 현미경 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하에서는 본 발명에 따른 미니뇌 구조체 및 이의 제조방법을 첨부된 도면을 참조하여 설명한다. 특별한 정의

가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따른 미니뇌 구조체를 도 1 내지 7을 참조하여 설명하면, 상기 미니뇌 구조체는 복수 개의 뇌 오가노이드들을 포함하며, 상기 복수 개의 뇌 오가노이드들 각각은 서로 다른 뇌 영역의 오가노이드이고, 상기 복수 개의 뇌 오가노이드들은 서로 결합되어 하나의 조직을 이루는 것을 특징으로 한다.

[0027] 상기 뇌 오가노이드는 유도만능줄기세포를 이용하여 뇌와 유사한 조직으로 분화시킨, 즉 뇌 조직과 유사한 3차원 세포 집합체를 의미하는데, 특정 뇌 영역(예컨대, 대뇌, 중뇌, 소뇌, 시상 등)과 유사한 조직을 가진다. 예컨대, 특정 뇌 영역인 대뇌와 유사한 조직을 가지는 뇌 오가노이드를 대뇌 오가노이드라 하며, 특정 뇌 영역인 중뇌와 유사한 조직을 가지는 뇌 오가노이드를 중뇌 오가노이드라 하고, 특정 뇌 영역인 소뇌와 유사한 조직을 가지는 뇌 오가노이드를 소뇌 오가노이드라 하고, 특정 뇌 영역인 시상과 유사한 조직을 가지는 뇌 오가노이드를 시상 오가노이드라 한다. 종래의 뇌 오가노이드는, 질환 원인을 규명하고 약물의 효능을 확인하는 등에 이용되는데, 종래의 단편적인 특정 뇌 영역의 오가노이드만으로는, 복잡하고 유기적인 연결로 결합되어 있는 인체의 뇌기능을 구현하기가 어려워, 뇌 오가노이드를 이용하는 목적을 효과적으로 달성하기가 어려웠다. 따라서, 본 발명은 특정 뇌 영역의 오가노이드들을 결합시켜 하나의 조직을 형성함으로써, 더욱 효과적으로 실제 뇌기능을 구현하는 것이 가능하도록 하였다.

[0028] 본 발명에서 미니뇌 구조체를 형성함에 있어, 도 1에 도시된 바와 같이, 미니뇌 구조체의 이용 목적에 따라 취사 선택된 오가노이드들을 결합하여 하나의 조직을 형성하게 된다. 모든 질환, 약물 등이 각각의 뇌 영역에 미치는 영향이 동일하다고 할 수 없으며, 질환, 약물 등에 따라서는 영향을 미치는 뇌 영역이 달라지게 된다. 예컨대, 특정 약물 A는 시상, 대뇌 및 소뇌에 영향을 미치나, 특정 약물 B는 시상 및 소뇌의 영향을 미친다고 하면, 약물 A의 효과를 확인하기 위해 미니뇌 구조체 이용 시, 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 소뇌 오가노이드를 결합시켜 형성한 미니뇌 구조체를 사용하는 것이 바람직하며, 약물 B의 효과를 확인하기 위해 미니뇌 구조체 이용 시, 시상 오가노이드 및 소뇌 오가노이드를 결합시켜 형성한 미니뇌 구조체를 사용하는 것이 바람직하다. 즉, 미니뇌 구조체의 사용 목적에 따라 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들을 선별적으로 결합시켜 하나의 조직을 이루는 미니뇌 구조체를 형성함으로써, 뇌오가노이드 이용의 목적을 달성하면서도 편리성 및 경제성을 향상시킬 수 있게 된다.

[0029] 또한, 본 발명에서 미니뇌를 구조체를 형성함에 있어, 도 1에 도시된 바와 같이, 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들의 결합 위치를 달리하여 형태가 다른 미니뇌 구조체를 형성할 수 있다. 예컨대, 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 소뇌 오가노이드를 결합시켜 형성한 미니뇌 구조체에 있어서, 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 소뇌 오가노이드를 연이어 결합시키는 경우, 자극에 의해 시상 오가노이드에서 발생한 시그널이 대뇌 오가노이드에 작용하여 대뇌 오가노이드에서 시그널이 발생하고, 대뇌 오가노이드에서 발생한 시그널이 소뇌 오가노이드에 작용하여 시그널이 발생하는 과정을 확인할 수 있으며, 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 소뇌 오가노이드를 서로 뭉쳐 결합시키는 경우, 자극에 의해 시상에서 발생한 시그널이 대뇌 오가노이드 및 소뇌 오가노이드에 동시에 작용하여 대뇌 오가노이드 및 소뇌 오가노이드 각각에서 시그널이 발생하는 과정을 확인할 수 있다. 즉, 미니뇌 구조체의 사용 목적에 따라 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들의 결합 위치를 달리하여 형태가 다른 미니뇌 구조체를 형성함으로써, 특정 뇌 영역의 오가노이드들 간의 상호 작용을 효과적으로 확인하는 것이 가능하게 된다.

[0031] 본 발명의 다른 실시예에 따른 미니뇌 구조체의 제조방법을 도 1 내지 7을 참조하여 설명하면, 상기 미니뇌 구조체의 제조방법은 미니뇌 구조체의 이용 목적에 따라, 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들을 취사 선택하는 선별단계와; 상기 선별단계에서 취사 선택된 오가노이드들이 각각 부유되어 있는 배지들을 균질화시키는 배지조성조절단계와; 상기 배지조성조절단계 후 배지들을 하나의 용기에 혼합하여 각각의 오가노이드들을 인접시키는 혼합단계와; 상기 혼합단계 후 각 오가노이드들의 결합을 유도하는 결합 유도 물질을 혼합된 배지에 추가한 후 배양하여 각 오가노이드들이 결합되어 하나의 조직을 이루도록 하는 결합유도단계 등을 포함한다.

[0032] 상기 선별단계는 미니뇌 구조체의 이용 목적에 따라, 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들을 취사 선택하는 단계로, 앞서 본 바와 같이 질환, 약물 등에 따라서는 영향을 미치는 뇌 영역이 달라질 수 있으므로, 상기 선별단계에서는 미니뇌 구조체 이용 목적에 따라 각기 다른 뇌 영역의 오가노이드들을 취사 선택하게 된다. 예컨대, 특정 약물 A는 시상, 대뇌 및 소뇌에 영향을 미친다고 하면, 상기 선별단계에서는 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 소뇌 오가노이드를 취사 선택하게 된다.

[0033] 상기 배지조성조절단계는 상기 선별단계에서 취사 선택된 오가노이드들이 각각 부유되어 있는 배지들을 균질화시키는 단계이다. 특정 뇌 영역의 오가노이드는 특이적 배지를 이용하여 유도만능줄기세포의 분화를 유도하여 형성되며, 특이적 배지에 부유 상태로 자라게 되므로, 오가노이드들이 각각 부유되어 있는 배지들을 바로 혼합하는 경우, 각 오가노이드가 사멸되는 문제가 발생하므로, 상기 배지조성조절단계에서는 일 오가노이드가 부유되어 있는 배지에, 동일량의 타 오가노이드용 배지들을 일정 기간에 걸쳐 점진적으로 혼합하여, 즉 각 오가노이드가 배양되는 배지의 조성이 동일해지도록 한다.

[0034] 상기 혼합단계는 상기 배지조성조절단계 후 배지들을 하나의 용기에 혼합하여 각각의 오가노이드들을 인접시키는 단계이다. 예컨대, 상기 혼합단계에서는 배양 접시에 오가노이드이 각각 부유되어 있는 배지들을 혼합하여 각각의 오가노이드들을 인접시킬 수 있으며, 또한, 도 1에 도시된 바와 같이 혼합된 배지에서 각 오가노이드들의 인접을 용이하게 하고, 인접되는 위치를 조절하기 위해 conical tude 등과 같은 오가노이드 배치용 용기(1)를 사용할 수 있다.

[0035] 상기 결합유도단계는 상기 혼합단계 후 각 오가노이드들의 결합을 유도하는 결합 유도 물질을 혼합된 배지에 추가한 후 배양하여 각 오가노이드들이 결합되어 하나의 조직을 이루도록 하는 단계로, 상기 결합유도물질로는 메트리겔, 콜라겐, 젤라틴 및 동물의 뇌조직에서 추출한 뇌의 세포외기질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상이 사용될 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예 1> 특정 뇌영역 오가노이드의 제작

[0040] 1. 인간 유도만능줄기세포를 이용한 3D 스페로이드의 제작

[0041] Laminin계열의 iMatrix-511로 코팅된 배양 용기에서, 인간 유도만능줄기세포(hiPSCs)를, 10μM ROCK inhibitor Y27632 및 bFGF가 포함된 StemFit Basic002 배지를 이용하여 배양하였다. 상기 세포가 배양 용기의 70 ~ 80%로 자라면 TrypLE Select를 처리하여 단일 세포로 분리하고, 분리한 세포를 원심분리 후 재부유시키고, Ultra-low attachment 96 well plate에 100,000cells/well로 분주하여 스페로이드를 제작하였다. 하기에서는 상기 스페로이드를 이용하여 특정 뇌영역 오가노이드 각각을 제작하였다.

[0042] 2. 대뇌 오가노이드의 제작

[0043] (1) 신경분화 유도 단계

[0044] DMEM-F12에 1X N2 supplement, 1X GlutaMAX supplement, 1X MEM-NEAA 및 1μg/ml heparin이 포함된 neural induction medium를 준비하고, 상기 스페로이드를 neural induction medium을 이용하여 4 ~ 5일 동안 배양하였다.

[0045] (2) 대뇌 오가노이드 패턴화 단계

[0046] 이후, Germ layer가 형성된 스페로이드를 MatriGel로 포매한 후, DMEM-F12와 Neurobasal medium을 1:1로 혼합한 배지에 0.5X N2 supplement, 62.5μl of insulin 1X GlutaMAX supplement, 0.5X MEM-NEAA, 1X penicillin-streptomycin 10 μM 2-mercaptoethanol 및 1X B27 supplement without vitamin A가 혼합되어 준비된 Cerebral organoid differentiation medium를 이용하여 5일간 배양하였다.

[0047] (3) 대뇌조직 성장 및 최종 분화 단계

[0048] 이후, Neuroepithelial bud가 형성되면 Cerebral organoid differentiation medium에서 vitamin A가 포함된 1X B27 supplement로 교체하여 약 15일간 분화를 유도하여, 배지(최종 배지)에 부유 상태로 존재하는 대뇌 오가노

이드를 제작하였다.

[0049] 3. 중뇌 오가노이드의 제작

[0050] (1) 신경분화 유도 단계

[0051] 상기 스페로이드를, DMEM-F12와 Antibiotic-Antimycotic을 포함하는 Neurobasal medium을 1:1로 혼합한 배지에 1X N2 supplement, 1X B27 without vitamin A, 1% Glutamax, 1% MEM-NEAA, 2-mercaptoethanol 0.175μL, 1μg/mL Heparin, 10μM SB431542, 200ng/mL Noggin, 0.8μM CHIR99021 및 10μM ROCK inhibitor가 혼합되어 준비된 Neuronal induction medium을 이용하여 48시간 배양 후, ROCK inhibitor를 제외한 배지를 이용하여 48 시간 동안 분화를 유도하였다.

[0052] (2) 중뇌 오가노이드 패턴화 단계

[0053] 이후, 신경분화 유도 단계의 결과물을, DMEM-F12와 Antibiotic-Antimycotic을 포함하는 Neurobasal medium을 1:1로 혼합한 배지에 1X N2 supplement, 1X B27 without vitamin A, 1% Glutamax, 1% MEM-NEAA, 2-mercaptoethanol 0.175μL, 1μg/mL Heparin, 10μM SB431542, 200ng/mL Noggin, 0.8μM CHIR99021, 100ng/mL(or 200ng/mL) SHH 및 100ng/mL FGF8가 혼합되어 준비된 Midbrain patterning medium을 이용하여 48시간 배양하였다.

[0054] (3) 중뇌조직 성장 단계

[0055] 이후, 패턴화된 오가노이드를 MatriGel로 포매한 후, Neurobasal medium에 1X N2 supplement, 1X B27 without vitamin A, 1% Glutamax, 1% MEM-NEAA, 2-mercaptoethanol 0.175μL, 2.5μg/mL insulin, 200ng/mL laminin, 100ng/mL(or 200 ng/mL) SHH, 100ng/mL FGF8 및 penicillin/streptomycin이 혼합되어 준비된 Tissue Growth Induction Medium을 이용하여 24시간 배양하였다.

[0056] (4) 최종 분화 단계

[0057] 이후, 상기 중뇌조직 성장 단계의 결과물을, Neurobasal medium에 1X N2 supplement, 1X B27 without vitamin A, 1% Glutamax, 1% MEM-NEAA, 2-mercaptoethanol 0.175μL, 10ng/mL BDNF, 10ng/mL GDNF, 100μM ascorbic acid, 125μM db-cAMP 및 penicillin/streptomycin이 혼합되어 준비된 Final Differentiation Medium에서 70rpm으로 shaking하며 최종 분화를 유도하여, 배지(최종 배지)에 부유상태로 존재하는 중뇌 오가노이드를 제작하였다.

[0058] 4. 소뇌 오가노이드의 제작

[0059] (1) 기본 배지 준비단계

[0060] DMEM-F12와 Neurobasal medium을 1:1로 혼합한 배지에, 1X N2 supplement, 1X B27 supplement, 5μg/mL insulin, 1.5 mM L-glutamine, 100μM non-essential amino acids(NEAA), 100U/L Pen/Strep 및 10μM beta-mercaptoethanol을 혼합하여, 소뇌 오가노이드 제작을 위한 기본 배지인 Neural Maintenance Medium(NMM)을 준비하였다.

[0061] (2) 신경 분화 유도 단계

[0062] 상기 스페로이드를, Neural Maintenance Medium(NMM)에 4ng/ml FGF2 및 10μM ROCK inhibitor를 혼합하여 준비된 배지에서 3일간 배양하고, 10μM ROCK inhibitor를 제거한 배지에서 4일간 배양하였다.

[0063] (3) 소뇌 오가노이드 패턴화 단계

[0064] 이후, 상기 신경 분화 유도 단계의 결과물을 NMM에 4ng/ml FGF2 및 1μM retinoic acid 및 100ng/ml FGF8B를 혼합하여 준비된 배지를 이용하여 7일간 배양 하였다.

[0065] (4) 소뇌조직 성장 단계

[0066] 이후, 패턴화된 오가노이드를, NMM에 4ng/ml FGF2, 100ng/ml FGF4 및 100ng/ml FGF8B를 혼합하여 준비된 배지를 이용하여 3일간 배양하고, FGF2 및 FGF4를 제거한 배지에서 5일간 배양하고, NMM에 100ng/ml BDNF 및 10ng/ml GDNF를 혼합하여 준비된 배지에서 7일간 배양하였다.

[0067] (5) 최종 분화 단계

[0068] 이후, 배지에 3ng/ml SAG 및 100ng/ml NT3 및 25mM KCl을 추가하여 약 7일간 배양하여, 배지(최종 배지)에 부유상태로 존재하는 소뇌 오가노이드를 제작하였다.

[0069] 5. 시상 오가노이드의 제작

[0070] (1) 신경분화 유도 단계

[0071] 상기 스페로이드를, DMEM-F12에 15% KSR, 1% MEM-NEAA, 1% Glutamax, 100mM b-Mercaptoethanol, 100nM LDN-193189, 10mM SB-431542, 4mg/ml Insulin, 5% heat-inactivated FBS 및 50mM Y27632를 혼합하여 준비된 induction media을 이용하여 분화를 유도하고, 2일 후에는 FBS가 제거된, 4일과 6일 후에는 Y27632가 제거된 배지로 교체하여 배양하였다.

[0072] (2) 시상 오가노이드 패턴화 단계

[0073] 상기 신경분화 유도 단계의 결과물을, DMEM-F12에 0.15% Dextrose, 100mM 2-mercaptoethanol, 1X N2 supplement, 1X B27 supplement minus vitamin A, 30ng/ml BMP7 및 1mM PD325901을 혼합하여 준비된 patterning media에서 80rpm/min shaking 상태로 8일간 배양하였다.

[0074] (3) 시상조직 성장 및 최종 분화 단계

[0075] 패턴화된 시상 오가노이드를, DMEM-F12와 Antibiotic-Antimycotic을 포함하는 Neurobasal medium을 1:1로 혼합한 배지에 0.5X N2 supplement, 0.5X B27, 1% Glutamax, 0.5% MEM-NEAA, 0.025% Insulin, 50mM 2-mercaptoethanol, 20ng/ml BDNF, 200nM ascorbic acid를 혼합하여 준비된 final Differentiation Medium에서 약 10일간 배양하여, 배지(최종 배지)에 부유상태로 존재하는 시상 오가노이드를 제작하였다.

[0077] <실시예 2> 특정 뇌영역 오가노이드가 제작되었음을 확인

[0078] 1. 특정 뇌영역 특이적 마커를 이용하여 확인

[0079] (1) 실시예 1에서 제작된 각각의 오가노이드에서 특정 뇌영역의 특이적 마커가 발현되는지 확인하기 위해 면역염색방법을 실시하였다. 구체적으로, 대뇌 오가노이드는 FOXG1과 SOX2로 염색하고, 시상 오가노이드는 TCF7L2와 MAP2로 염색하고, 소뇌 오가노이드는 KIRREL2와 MAP2로 염색하고, 중뇌 오가노이드는 TH로 염색하여, 공초점 현미경(Confocal microscope)으로 형광을 확인하여, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0080] (2) 도 2를 보면, 대뇌 오가노이드에서 대뇌의 특이적 단백질이 발현되었음을 확인할 수 있고, 시상 오가노이드에서 시상의 특이적 단백질이 발현되었음을 확인할 수 있고, 소뇌 오가노이드에서 소뇌의 특이적 단백질이 발현되었음을 확인할 수 있고, 중뇌 오가노이드에서 중뇌의 특이적 단백질이 발현되었음을 확인할 수 있다.

[0081] 2. MEA를 사용하여 얻은 생체 전기신호를 이용하여 확인

[0082] (1) 다채널전극배열 시스템(Multielectrode Array(MEA) System)은 신경세포의 활동전위를 측정하는 장비로, 뇌오가노이드의 활동 전위 변화를 측정함으로써 전기생리학적 변이 분석, 신경세포의 이온채널의 변화, 신호전달 속도, 신경세포간의 신호전달 검출 등의 분석에 이용되고 있다. 이에 따라, 실시예 1에서 제조된 각각의 오가노이드의 생체 전기신호를 MEA를 통해 확인하였다. 구체적으로, MEA 기판을 Polyetherimide(PEI)로 코팅 후, laminin으로 재코팅하여 실시예 1에서 제조된 오가노이드 각각을 올리고 신호를 측정하여, 그 결과를 도 3(도 3의 (a)는 대뇌 오가노이드의 실험 결과, (b)는 시상 오가노이드의 실험 결과, (c)는 소뇌 오가노이드의 실험 결과, (d)는 중뇌 오가노이드의 실험 결과임)에 나타내었다.

[0083] (2) 도 3을 보면, 각각 오가노이드는 차이나는 자발적(spontaneous) 전기 신호를 발생시킴을 확인할 수 있어, 각각 오가노이드는 서로 다른 신경 세포 이루어져 있음을 알 수 있다.

[0085] <실시예 3> 미니뇌 구조체의 제작

[0086] 1. 미니뇌 구조체 1의 제작

[0087] (1) 배지에서 부유 상태로 자라는 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 중뇌 오가노이드를 결합시켜 미니뇌 구조체 1을 형성하기 위해, 실시예 1에서 제조된 각 오가노이드의 배지의 조성을 동질화시켰다. 구체적으로, 시상 오가노이드가 부유되어 있는 최종 배지에, 동일량의 대뇌 오가노이드용 최종 배지 및 중뇌 오가노이드용 최종

배지를 1주일에 걸쳐 점진적으로 혼합하고, 대뇌 오가노이드가 부유되어 있는 최종 배지에, 동일량의 시상 오가노이드용 최종 배지 및 중뇌 오가노이드용 최종 배지를 1주일에 걸쳐 점진적으로 혼합하고, 중뇌 오가노이드가 부유되어 있는 최종 배지에, 동일량의 시상 오가노이드용 최종 배지 및 대뇌 오가노이드용 최종 배지를 1주일에 걸쳐 점진적으로 혼합하여, 각 오가노이드가 배양되는 배지는 시상 오가노이드용 최종 배지, 대뇌 오가노이드용 최종 배지 및 중뇌 오가노이드용 최종 배지가 1:1:1의 농도로 혼합되도록 하여, 즉 각 오가노이드가 배양되는 배지의 조성이 동일해지도록 하였다.

[0088] (2) 이후, 도 4에 도시된 바와 같이 각 오가노이드가 부유 상태로 존재하는 배지를 혼합하고, 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드, 중뇌 오가노이드를 인접시켰다.

[0089] (3) 이후, 각 오가노이드의 결합을 유도하게 위해 메트리겔(Matrigel)을 혼합 배지에 추가하고 2일 동안 배양하여, 미니뇌 구조체 1을 제작하였다.

[0090] 2. 미니뇌 구조체 2의 제작

[0091] (1) 배지에서 부유 상태로 자라는 소뇌 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 중뇌 오가노이드를 결합시켜 미니뇌 구조체 2를 형성하기 위해, 실시예 1에서 제조된 각 오가노이드의 배지의 조성을 동질화시켰다. 구체적으로, 중뇌 오가노이드가 부유되어 있는 최종 배지에, 동일량의 대뇌 오가노이드용 최종 배지 및 중뇌 오가노이드용 최종 배지를 1주일에 걸쳐 점진적으로 혼합하고, 대뇌 오가노이드가 부유되어 있는 최종 배지에, 동일량의 소뇌 오가노이드용 최종 배지 및 중뇌 오가노이드용 최종 배지를 1주일에 걸쳐 점진적으로 혼합하고, 중뇌 오가노이드가 부유되어 있는 최종 배지에, 동일량의 소뇌 오가노이드용 최종 배지 및 대뇌 오가노이드용 최종 배지를 1주일에 걸쳐 점진적으로 혼합하여, 각 오가노이드가 배양되는 배지는 소뇌 오가노이드용 최종 배지, 대뇌 오가노이드용 최종 배지 및 중뇌 오가노이드용 최종 배지가 1:1:1의 농도로 혼합되도록 하여, 즉 각 오가노이드가 배양되는 배지의 조성이 동일해지도록 하였다.

[0092] (2) 이후, 각 오가노이드가 부유 상태로 존재하는 배지를 혼합하고, 소뇌 오가노이드, 대뇌 오가노이드, 중뇌 오가노이드를 인접시켰다.

[0093] (3) 이후, 각 오가노이드의 결합을 유도하게 위해 메트리겔(Matrigel)을 혼합 배지에 추가하고 2일 동안 배양하여, 미니뇌 구조에 2를 제작하였다.

[0095] <실시예 4> 미니뇌 구조체가 제작되었음을 확인

[0096] 1. 실시예 3의 1에서 제작된 미니뇌 구조체 1을 디지털 카메라로 촬영하여 그 결과를 도 5에 나타내었고, 각 오가노이드의 결합과정 중의 미니뇌 구조체 1을 현미경으로 확인하여 그 결과를 도 6에 나타내었고, 각 오가노이드의 결합과정 중 및 결합 완료 후에 실시예 3의 2의 미니뇌 구조체 2를 각각 현미경으로 확인하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0097] 2. 도 5 및 6을 보면, 미니뇌 구조체 1은 시상 오가노이드, 대뇌 오가노이드 및 중뇌 오가노이드가 연이어 결합되어 하나의 조직을 이룸을 확인할 수 있고, 도 7은 중뇌 오가노이드, 소뇌 오가노이드 및 대뇌 오가노이드가 서로 연결되어 하나의 조직을 이룸을 확인할 수 있다.

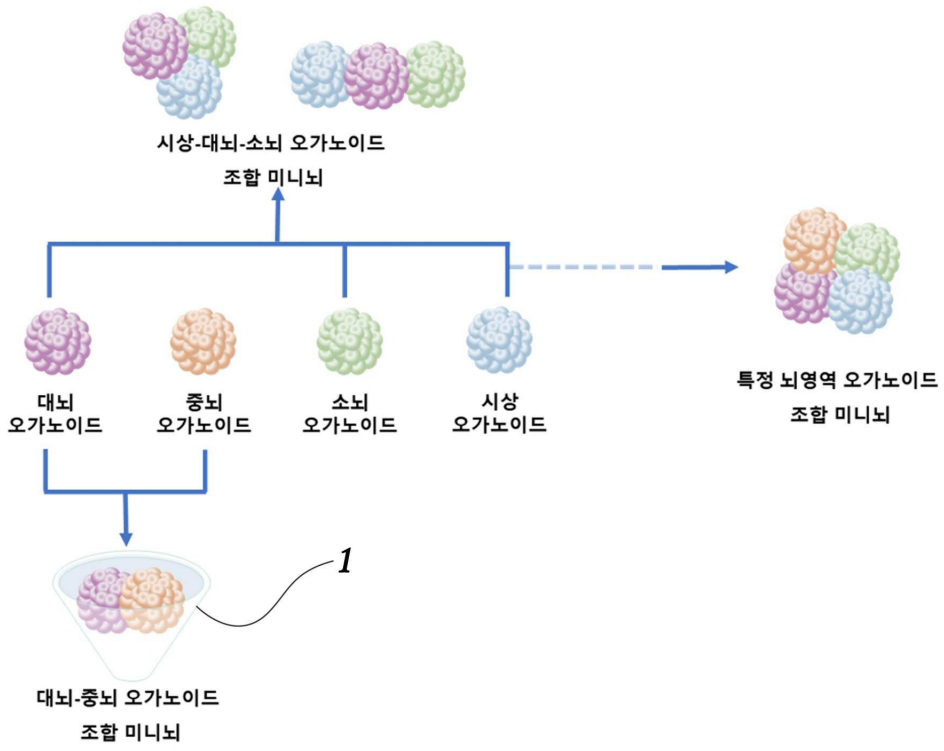
[0099] 이상에서, 출원인은 본 발명의 바람직한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경예 또는 수정예도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

부호의 설명

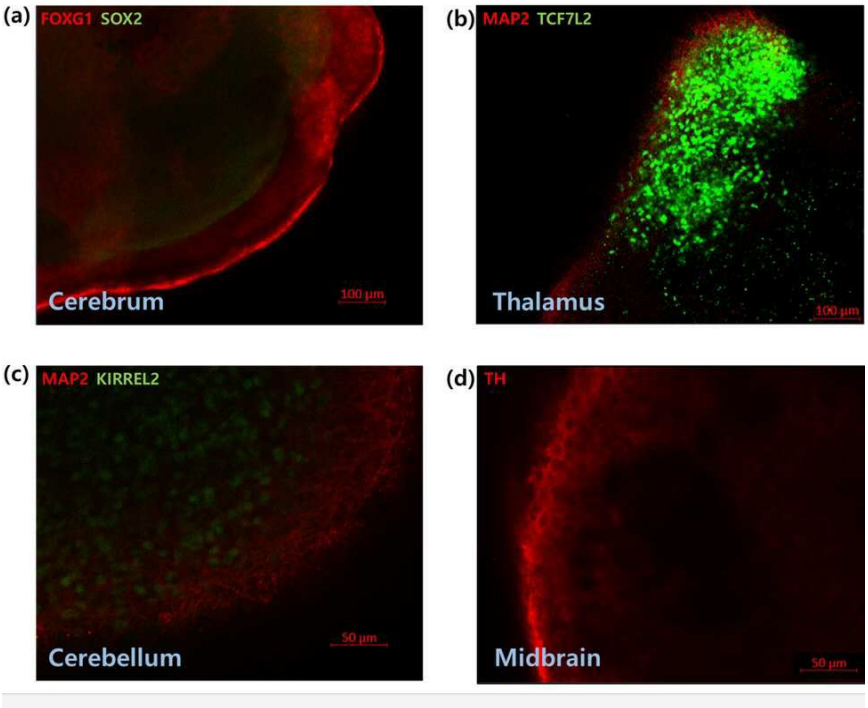
[0100] 1: 오가노이드 배치용 용기

도면

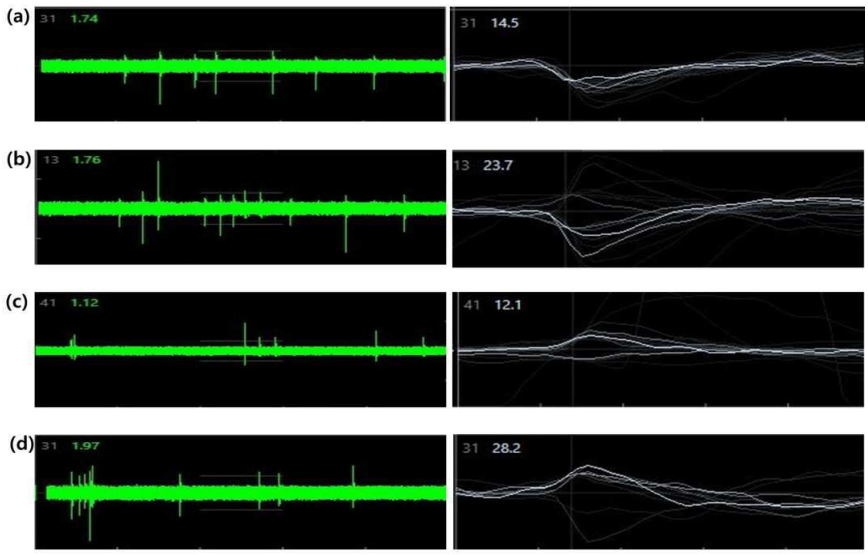
도면1


시상-대뇌-소뇌 오가노이드
조합 미니뇌
대뇌
오가노이드
중뇌
오가노이드
소뇌
오가노이드
시상
오가노이드
특정 뇌영역 오가노이드
조합 미니뇌
1
대뇌-중뇌 오가노이드
조합 미니뇌

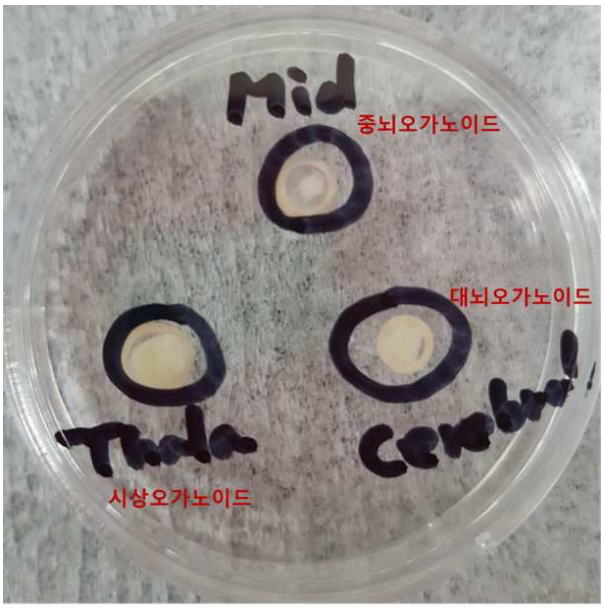
도면2


(a)
FOXG1 SOX2
Cerebrum
100 μm
(b)
MAP2 TCF7L2
Thalamus
100 μm
(c)
MAP2 KIRREL2
Cerebellum
50 μm
(d)
TH
Midbrain
50 μm

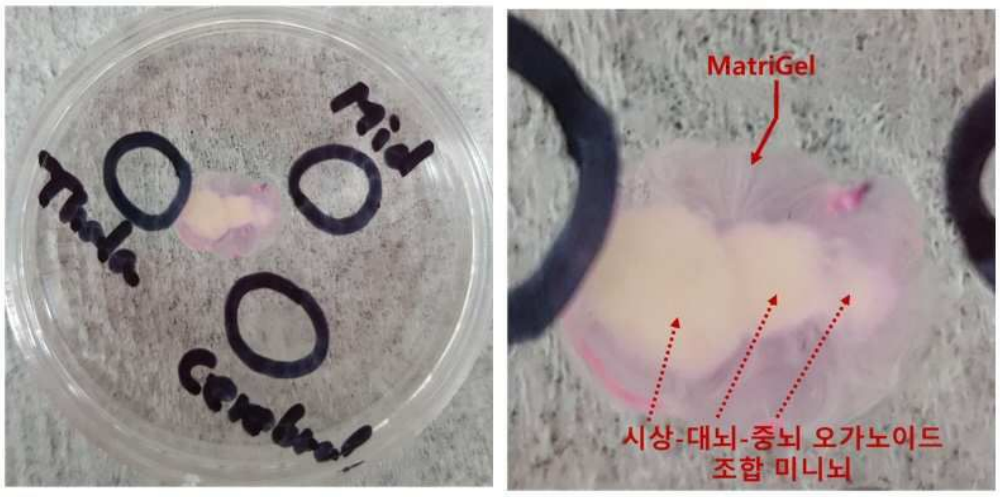
도면3


(a)
31 1.74
31 14.5
(b)
13 1.76
13 23.7
(c)
41 1.12
41 12.1
(d)
31 1.97
31 28.2

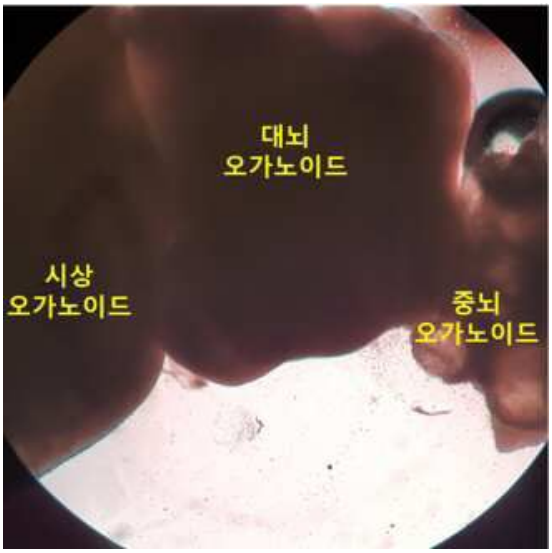
도면4


Mid
중뇌오가노이드
대뇌오가노이드
Thala
시상오가노이드

도면5


MatriGel
시상-대뇌-중뇌 오가노이드
조합 미니뇌

도면6


대뇌
오가노이드
시상
오가노이드
중뇌
오가노이드

도면7


중뇌
오가노이드
소뇌
오가노이드
대뇌
오가노이드
결합된 미니뇌 구조체