



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월19일
(11) 등록번호 10-1837293
(24) 등록일자 2018년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 13/00 (2017.01)
C12N 5/00 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0633 (2013.01)
C12N 13/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0116395
(22) 출원일자 2016년09월09일
심사청구일자 2016년09월09일
(56) 선행기술조사문헌
Acta Biomaterialia. 1 Sep 2016,45:121-132.*
STEM CELLS. July 2016,35:97-105.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
임재열
인천광역시 연수구 해송로30번길 19, 305동 2202호 (송도동, 송도웰카운티3단지아파트)
고원건
서울특별시 서초구 효령로 164, 6동 502호 (뿔면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 9 항

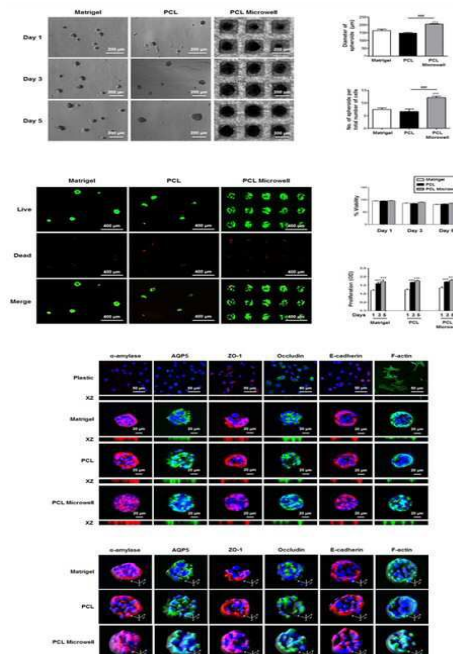
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 인간 타액선 세포 기반 3차원 체외 배양을 통한 선 조직 유사 오가노이드 형성 방법 및 이를 이용한 타액선 질환 모델의 용도

(57) 요약

본 발명은 3차원 체외 배양을 통한 인간 타액선 줄기세포(salivary gland-derived glandular stem) 또는 타액선 전구세포(salivary gland-derived progenitor cells) 기반 선 조직 유사 오가노이드(acinar-like organoid) 형성 방법 및 이를 이용한 타액선 기능 저하 질환 모델의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 타액선 유래 선 줄기세포 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



포 또는 선 전구세포의 3차원 체외 배양 및 분화 유도를 통해 유사 선 조직(acinar-like organoid)을 형성 후 방사선을 조사하여 방사선으로 타액선 조직이 손상되는 질환, 특히 구강건조증을 모사하기 위한 것으로, 이와 같은 선 줄기세포 또는 선 전구세포 기반 3차원 체외 세포배양을 통한 질환 모델은 기존의 이차원적 세포배양법에 비해 질환 모사 특성이 우수하다. 또한, 상기 선 줄기세포 또는 선 전구세포 3차원 배양 질환모델을 이용하여 타액선 기능 저하 질환 치료를 위한 약물을 스크리닝할 수 있으며, 이를 통해 얻어진 약물은 타액선 기능 저하 질환, 특히 구강건조증을 예방 및 치료하기 위한 치료제로 개발될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 5/0062 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

G01N 2800/18 (2013.01)

최정석

서울특별시 마포구 백범로25길 63, 104동 404호 (염리동, 염리삼성래미안)

(72) 발명자

신현수

인천광역시 서구 장고개로309번길 19, 405동 102호
(가좌동, 진주아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C2807010015

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술진흥사업

연구과제명 난치성 구강건조증 치료를 위한 고순도 기능강화 선줄기세포 이식치료기술 확립

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2015.12.01 ~ 2016.11.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 타액선 조직으로부터 분리된 타액선 전구세포 또는 타액선 줄기세포를 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 3차원 배양하는 단계; 및

(2) 상기 3차원 배양을 통해 오가노이드(organoid)를 형성시키는 단계를 포함하며, α -amylase, AQP5, CK7, CK16, E-cadherin 및 ZO-1의 발현이 증가된 타액선 세포 기반 타액선 조직 유사 오가노이드(acinar-like organoid) 형성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드는 직경 100 내지 500 μm 의 정사각형 형태인 것을 특징으로 하는 타액선 세포 기반 타액선 조직 유사 오가노이드 형성 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드의 바닥은 나노섬유로 이루어지고, 벽은 하이드로겔로 이루어진 것을 특징으로 하는 타액선 세포 기반 타액선 조직 유사 오가노이드 형성 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 타액선 조직 유사 오가노이드의 직경은 200 μm 인 것을 특징으로 하는 타액선 세포 기반 타액선 조직 유사 오가노이드 형성 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 3차원 배양은 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에 3 ~ 7일 동안 분화유도 배지를 이용하여 배양하는 것을 특징으로 하는 타액선 세포 기반 타액선 조직 유사 오가노이드 형성 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 타액선 조직 유사 오가노이드는 세포간 밀착 결합을 통한 전구세포의 기능 강화로 세포 내 칼슘의 농도가 증가하고, 타액의 성분인 아밀라제를 분비하는 것을 특징으로 하는 타액선 세포 기반 타액선 조직 유사 오가노이드 형성 방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항, 제6항 및 제8항 중 어느 한 항의 방법에 따라 형성된 타액선 조직 유사 오가노이드에 방사선을 조사하는 단계를 포함하는 타액선 기능 저하 질환 모델 구축방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 방사선 조사는 10 내지 20Gy의 방사선을 조사하는 것을 특징으로 하는 타액선 기능 저하 질환 모델 구축방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 타액선 기능 저하 질환은 구강건조증인 것을 특징으로 하는 타액선 기능 저하 질환 모델 구축방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3차원 체외 배양을 통한 인간 타액선 줄기세포(salivary gland-derived glandular stem) 또는 타액선 전구세포(salivary gland-derived progenitor cells) 기반 선 조직 유사 오가노이드(acinar-like organoid) 형성 방법 및 이를 이용한 타액선 기능 저하 질환 모델의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 구강건조증(xerostomia)은 입이 마른다고 느끼는 주관적인 증상을 의미한다. 구강건조증은 객관적인 타액분비의 저하에 의해 발생하며, 타액의 성분에 변화가 있어도 그 증상이 유발된다고 알려져 있다. 구강건조증을 가진 환자들은 말을 하거나 음식을 먹을 때 어려움을 호소하며, 타액의 분비가 적은 구강건조증 환자의 경우에는 충치나 세균감염, 미각의 변화, 구취, 구강의 작열감과 같은 증상을 호소하기도 한다. 또한 노인의 경우 구강 위생 악화, 연하 장애 등으로 인한 오연성 폐렴 등과 같은 전신 질환에 이환될 위험성도 높아지는 것으로도 알려져 있다. 구강건조증의 유병율은 최대 64.8%까지로 다양하며, 65세 이상의 인구에서 30% 정도가 구강건조증을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)이나 두경부 종양으로 방사선 치료를 받은 환자들의 구강건조증 유병율은 거의 100%에 이른다고 알려져 있다.

[0003] 구강건조증을 일으키는 원인으로는 매우 다양한 인자가 알려져 있다. 생리적인 탈수나 신경학적, 인지기능의 이상이 있을 경우에 구강건조증이 생길 수 있으며, 우울증이나 불안장애 및 스트레스와 같은 감정의 변화나 영양 장애가 있을 때에도 구강건조증이 나타나기도 한다. 구강건조증의 가장 흔한 원인 중의 하나는 약물의 복용이다. 항응고제, 항우울제, 항고혈압제, 항바이러스제, 당뇨치료제 등이 구강건조증을 유발하는 흔한 약물로 알려져 있으며, 쇼그렌 증후군을 앓거나 두경부 영역의 방사선 치료를 받은 경우에 유발되기도 하며, 전신질환이나 타액선의 외상 및 종양에 의해서도 유발될 수 있다.

[0004] 구강건조증을 치료하기 위한 다양한 치료전략들이 연구되고 있는데, 일차적인 목적은 환자의 증상을 줄이고, 타액의 분비량을 늘리는 것이다. 가장 기본적인 방법 중의 하나는 적절한 수분을 공급하고, 구강건조증을 악화시킬 수 있는 치약이나 음식물 섭취 등을 자제하며, 저작 및 타액분비에 도움을 주는 무설탕 껌 등의 사용이다. 이외에도 구강 점막에 윤활제나 타액 성분의 대체제, 타액선 자극제 등의 사용도 증상의 경감에 도움이 될 수 있다. 하지만 이는 대부분 증상 경감을 위한 보존적인 치료수단에 불과하다.

[0005] 특히, 두경부 영역에 방사선 치료를 받는 환자는 세기조절 방사선 치료(intensity-modified radiation therapy)를 받아 타액선을 방사선 조사로부터 일부 보호할 수 있으나 효과가 제한적이고, 방사선 치료 전에, 악하선의 위치를 수술적으로 이동시켜 방사선량을 최소화하는 악하선 치환술을 시행하기도 하나 방사선 조사부위와 치환 부위가 근접하기 때문에 그 효과가 의문시 된다. 최근 구강의 전기 자극이나 침(acupuncture)을 이용하여 타액 분비를 증가시키려는 연구도 시도되고 있다.

[0006] 약물치료 요법으로, 방사선 조사 전 타액선 세포 보호제인 아미포스틴(amifostine) 등의 약물을 사용해 볼 수 있으나 다양한 부작용으로 임상에서 거의 사용되고 있지 않다. 특히, 아미포스틴은 저혈압이나 원치 않는 종양 세포 보호 등의 부작용이 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 필로카르핀(Pilocarpine)과 세비멜린(cevimeline)은 타액분비저하증이 진단된 환자에서 사용할 수 있는, 미국

식품의약국 (FDA)의 승인을 받은 타액분비 촉진제이다. 필로카르핀은 무스카린(muscarine)의 부교감신경을 자극하고, 세비멜린은 M3 무스카린 수용체와 강한 친화력을 보이는 타액선 자극제로 알려져 있다. 필로카르핀은 쇼그렌 증후군과 방사선 조사에 의한 구강건조증 치료제로 승인되었으며, 세비멜린은 쇼그렌 증후군의 치료에 승인이 되었다. 이러한 약물들은 기능을 하는 타액선의 잔여조직이 남아있어야 효과적일 수 있다. 필로카르핀의 부작용으로 땀 분비의 증가, 피부 혈관의 확장, 오심 및 구토, 설사, 딸꾹질, 기관지 축소, 저혈압, 빈맥, 증가된 빈뇨, 시야의 이상 등을 초래할 수 있다. 필로카르핀과 세비멜린은 조절이 되지 않는 천식환자나 만성폐질환, 베타 차단제를 사용하고 있는 환자에게 상대적으로 금기가 되며, 급성 위궤양이나 조절되지 않은 고혈압 환자들에게 조심스럽게 사용되어야 한다. 필로카르핀은 협각 녹내장이나 홍채염 환자에게 또한 금기가 될 수 있다. Anethole trithione은 담즙배출 촉진제로서 구강건조의 증상을 완화시키고 타액의 분비를 촉진시킨다고 알려져 있으나 아직 더 많은 연구가 필요하다. 하지만, 이들 약물치료법은 타액선 기능이 남아 있는 환자에게만 적용할 수 있기 때문에 타액선 조직 손상이 상당한 경우에는 치료 효과가 제한적이다.

[0008] 따라서 여러 가지 원인에 따른 구강건조증 환자의 높은 유병율과 함께 인간수명연장에 따른 삶의 질에 대한 관심의 증가에 따라 구강건조증에 대한 치료제 개발이 시급하나 아직까지 타액선의 비가역적인 손상에 대한 근본적인 치료방법이 없는 상태이다. 이와 같은 영구적 구강건조증 질환을 치료하기 위해서는 비가역적 원인에 따른 타액선 조직의 변화에 대한 이해를 바탕으로 구강건조증을 유발하는 타액선의 비가역적 손상의 메커니즘을 규명하고 이를 통해 손상된 타액선의 기능을 보존하기 위한 치료약물 개발 전략을 수립하여야 할 필요성이 있다.

[0009] 새로운 치료약물을 발굴 및 개발하기 위해서는 생체를 모사할 수 있으며 질환의 특성을 잘 나타내는 모델 개발이 필수적이다. 현재까지 가장 정확하고 신뢰할 수 있는 생물학적 분석은 동물을 이용한 실험이며 동물을 이용한 분석이 독성학이나 신약 스크리닝과 같은 생물학적 분석 분야에서 높은 정확도의 장점을 가지나 여러 단점도 가지고 있다.

[0010] 즉, 동물을 직접 이용하면 외부 자극에 대한 전체적인 신체 혹은 기관들의 반응을 직접적으로 관찰할 수 있다는 장점이 있으나, 모든 실험을 동물로 진행하기에는 비용과 시간이 많이 소비된다는 단점이 있으며 특히 생명현상 기전 연구를 위해서는 살아있는 마우스 등을 이용한 생체 모델을 사용해야 하기 때문에 엄청난 비용과 시간이 필요하고 실험 조건 및 결과의 정밀한 컨트롤이 어려우며 고해상도 이미징 및 분석이 어려운 단점이 있다. 또한 동물에 대한 윤리적 문제도 존재하므로, 이를 대체 또는 보완할 수 있는 생물학적 분석 방법이 필요하였다.

[0011] 이를 대신하고 최소화하기 위해 동물의 가장 기본 단위인 세포를 활용하여 다양한 생물학적 모델을 제작하고 이를 분석을 하려는 노력이 활발히 진행 중이며 최근 세포를 이용한 약물 스크리닝 방법은 많은 연구들을 통해 보다 고집적화 형태로 발전하고 있다.

[0012] 그러나 아직까지도 신약에 대한 평가는 동물 또는 임상 실험이 유일한 방법이며 세포 배양모델을 통한 평가는 단기적이고 부분적인 효과 검증만이 가능한 현실이다. 다양한 신약 후보물질이 제시되고 있지만 효능 및 부작용을 정확하게 예측하지 못해 동물 및 임상 실험 단계에서 많은 비율의 후보물질들이 탈락하고 이는 개발 과정의 시간 및 비용의 증가로 이어진다. 이러한 추세 속에서 많은 수의 후보물질들 중에서 타깃 후보물질을 발굴하고 검증하기 위한 신속하고 정확한 평가, 검증이 필수적인데, 즉, 개발 과정의 비용 및 시간을 줄이고 효율성을 높이기 위해서는 적은 비용이 드는 임상전단계에서 후보약물의 효능 및 부작용을 정확하게 예측하는 것이 필수적이라 할 수 있다.

[0013] 현재 실험실에서 쓰이고 있는 일차배양 세포모델의 경우 해당 장기 또는 조직에서 유래한 세포를 인공적으로 불멸화(immortalized) 시키거나 2차원적으로 평면배양하면서 후보물질의 효능 및 독성을 검증하게 된다. 하지만 2차원적으로 인공적으로 배양되는 세포들은 조직에서 분리된 후 배양되는 과정에서 본래 세포 형태의 변화뿐만 아니라 조직 단위의 세포 기능을 일부 상실하게 되며 아울러 세포외환경(ECM, microenvironment)과의 연결이 단절되어 실제 생체에서 나타나는 현상을 반영하지 못하는 치명적인 단점이 있다. 뿐만 아니라 인간 세포가 아닌 경우 종간 차이로 인해 약물의 작용 및 기전이 인간과 동일하지 않은 경우가 많아 이로 인해 효율적인 약물 개발의 발전이 저해가 되고 시간과 비용 또한 많이 소요가 된다.

[0014] 이를 보완하기 위한 기술로 최근 3차원(3D) 세포 배양 기반 생체조직을 모사하는 모델에 대한 많은 연구가 이루어져 오고 있다. 특히 3D 오가노이드 배양 방식은 암세포 등의 3차원 배양의 가장 전통적인 모델로서 최근 암 오가노이드가 이차원 단층세포 배양보다 실제 암 조직의 유전자 발현이 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0015] 3차원 오가노이드를 형성하는 바닥면이 깔대기 형성인 웰에 복수의 단일세포를 파종하고, 바닥면에서 단일 세포를 응집 및 분열시켜 오가노이드를 배양하는 방법, 폴리머 혼합물을 표면에 물로 겔로 시키고, 겔로에 의해 생

긴 미소한 물방울을 증발시킴으로써 얻어지는 육각형의 허니콤 구조체 상에서 오가노이드를 배양하는 방법 등과 같은 다양한 방법이 개발되었다.

[0016] 배양에 의해 생기는 오가노이드의 터전이 없고, 세포 배양 구조체 또는 세포 배양 용기에 오가노이드가 고정되기 어려운 점 때문에 배지 교환시 오가노이드가 배지와 함께 없어지거나 배지 교환 작업이 상당히 번잡해져서 양호한 배양 환경을 유지하는 것이 어려워지는 근본적인 배양상의 문제점으로 지적되었다.

[0017] 또한 복수의 세포가 응집하여 오가노이드를 형성하고 있기 때문에, 암세포의 동태를 시뮬레이션 하려고 해도, 생체 내에서 하나의 암세포로부터 분열되어 형성된 종양의 성질과 오가노이드의 성질이 엄밀하게 다르기 때문에 시뮬레이션의 정밀도가 떨어지는 문제점이 있다.

[0018] 최근 몇 년간 미세유체기술, 또는 미세공정 기술을 바이오에 응용하여 인체 장기의 미세조직구조를 모사하는 기술들이 개발되고 있다. 장기 온 어 칩(Organ-on-a-chip)으로 알려진 이러한 기술은 기존의 단순한 2차원 평면 세포 배양 모델에서 탈피하여 인체 조직에 조금 더 근접한 실험실 모델로 평가받고 있다. 그러나 아직까지 이러한 생체모사 장기 온 어 칩 모델은 초기 개발 단계에 머물러 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0019] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2010-0123996호(2010.11.26 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명의 목적은 선 조직 유래 선 줄기세포 또는 선 전구세포의 3차원 배양 및 분화 유도를 통해 미세 유사 선 조직(acinar-like organoid)을 형성하는 인간 선 세포 기반 3차원 체외 배양을 통한 오가노이드 형성 방법을 제공하는데 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 다른 목적은 방사선을 조사하여 방사선으로 타액선 조직이 손상되는 타액선 기능 저하 질환, 특히 구강건조증을 모사하기 위한 것으로, 이러한 인간 타액선세포 기반 3차원 체외 배양을 통한 질환모델 구축 방법을 제공하는데 있다.

[0022] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 3차원 체외 배양법을 통해 획득되는 선 조직 유사 오가노이드에 기반하는 타액선 기능 장애 치료를 위한 신약을 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 선 조직으로부터 분리된 선 전구세포 또는 선 줄기세포를 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 3차원 배양하는 단계; 및 (2) 상기 3차원 배양을 통해 오가노이드(organoid)를 형성시키는 단계를 포함하는 3차원 배양을 통한 선 세포 기반 선 조직 유사 오가노이드(acinar-like organoid) 형성 방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 형성된 선 조직 유사 오가노이드에 방사선을 조사하는 단계를 포함하는 타액선 기능 저하 질환 모델 구축방법을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 구축된 타액선 기능 저하 질환 모델을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 타액선 기능 저하 질환 모델에 후보약물을 접촉시키는 단계; 및 대조군과 비교하여 상기 후보약물의 타액선 기능 저하 완화 정도를 판단하는 단계를 포함하는 타액선 기능 저하 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 3차원 체외 배양을 통한 인간 타액선 줄기세포(salivary gland-derived glandular stem) 또는 타액선 전구세포(salivary gland-derived progenitor cells) 기반 선 조직 유사 오가노이드(acinar-like organoid) 형성 방법 및 이를 이용한 타액선 기능 저하 질환 모델의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 타액선 유래 선 줄기

세포 또는 선 전구세포의 3차원 체외 배양 및 분화 유도를 통해 유사 선 조직(acinar-like organoid)을 형성 후 방사선을 조사하여 방사선으로 타액선 조직이 손상되는 질환, 특히 구강건조증을 모사하기 위한 것으로, 이와 같은 선 줄기세포 또는 선 전구세포 기반 3차원 체외 세포배양을 통한 질환 모델은 기존의 이차원적 세포배양법에 비해 질환 모사 특성이 우수하다. 또한, 상기 선 줄기세포 또는 선 전구세포 3차원 배양 질환모델을 이용하여 타액선 기능 저하 질환 치료를 위한 약물을 스크리닝할 수 있으며, 이를 통해 얻어진 약물은 타액선 기능 저하 질환, 특히 구강건조증을 예방 및 치료하기 위한 치료제로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 분리한 선 전구세포를 3차원 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 배양한 후에 형성되는 오가노이드를 형성 정도를 분석하기 위한 오가노이드 크기 측정 및 면역형광염색 결과를 나타낸다.
- 도 2는 전구세포를 3차원 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 배양한 후에 오가노이드의 형성 정도와 기능을 분석하기 위한 PCR 신호, 웨스턴 블롯, 아밀레이즈 활성도, 세포내 칼슘 농도를 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 3차원 배양을 통해 분리한 선 줄기세포의 특성 분석을 위한 분화에 관한 염색 및 PCR 신호 결과를 나타낸다.
- 도 4는 3차원 배양을 통해 분화된 세포의 특성 분석을 위한 PCR 신호, 웨스턴 블롯, 면역형광염색 결과를 나타낸다.
- 도 5는 3차원 배양을 통해 분화된 세포에 방사선 조사 후 3차원 오가노이드의 특성을 PCR 신호, 웨스턴 블롯, 면역형광염색 결과를 나타낸다.
- 도 6은 3차원 배양을 통해 분화된 세포에 방사선 조사 후 3차원 오가노이드의 특성 및 기능을 PCR 신호, 웨스턴 블롯, 아밀레이즈 활성도, 세포 내 칼슘농도 분석 결과를 나타낸다.
- 도 7은 3차원 배양을 통해 분화된 세포에 방사선 조사 후 3차원 오가노이드와 줄기세포와 co culture하여 오가노이드를 이용한 약물 스크리닝을 분석하기 위해 PCR 신호, ELISA, Microarray 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 타액선 조직은 타액을 생성하는 오가노이드 형태의 선 단위(acinar unit)와 생성된 타액이 배출되는 도관(ductal compartment)으로 구성되어 있는데, 본 발명에서는 타액선에 분리한 세포가 3차원 배양시 오가노이드 형태로 조직화되어 2차원 평면 배양에 비해 선 조직의 표현형 발현이 증가하고 타액 생성 기능이 월등히 향상됨을 확인하였고 이를 바탕으로 선 조직 오가노이드(organoid)로 분화시키고 방사선 조사 방식 등으로 3차원 오가노이드 질환모델을 구축할 수 있었다.
- [0030] 이는 기존의 2차원 평면 배양모델의 한계를 극복할 뿐만 아니라 기존 3차원 배양기술의 단점인 제작 시간, 비용, 불균일한 세포분화 등의 단점도 해결할 수 있다. 아울러 타액선의 해부학적 위치상 자가 조직을 쉽게 채취할 수 있을 뿐만 아니라 타액선 조직 세포의 특성상 쉽게 오가노이드 형성이 가능하고 질환 모델 모사가 용이한 장점이 있다. 또한 생체내 미세환경을 보다 더 잘 반영할 뿐만 아니라 세포 기능 변화를 쉽게 측정할 수 있어 새로이 발굴하는 신약의 성능을 효율적으로 평가할 수 있다. 또한 이러한 3차원 배양을 보다 발전시켜 고속, 저비용의 효율적인 약물검증시스템으로 개발할 수 있다.
- [0031] 이에 본 발명자들은 최적의 3차원 체외 오가노이드 크기를 결정하여 이를 규격화, 정량화할 수 있도록 하이드로젤 패터닝과 나노섬유 마이크로어레이 기법을 통한 마이크로웰(micro-well) 형태의 3차원 배양시스템을 이용하여 인간 타액선 세포를 이용한 선 조직 유사(acinar-like) 오가노이드를 형성할 수 있음을 발견하였고, 방사선 조사법 등을 통한 질환을 모사할 수 있음을 확인하여 이에 본 발명을 완성하였다.
- [0032] 본 발명은 (1) 선 조직으로부터 분리된 선 전구세포 또는 선 줄기세포를 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 3차원 배양하는 단계; 및 (2) 상기 3차원 배양을 통해 오가노이드(organoid)를 형성시키는 단계를 포함하는 3차원 배양을 통한 선 세포 기반 선 조직 유사 오가노이드(acinar-like organoid) 형성 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드는 균일한 크기의 오가노이드 형성을 대량으로 유도할 수 있고, 안정적으로 배양 및 회수가 가능하며, 오가노이드가 형성되는 나노섬유 기반의 마이크로 영역과 세포의 부착이 일어나지 않는 하이드로젤 기반의 마이크로 영역으로 구성된 스케폴드일 수 있다.
- [0034] 바람직하게는, 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드는 직경 100 ~ 500 μm 의 정사각형 형태일 수 있고,

가장 바람직하게는 200 μm 의 정사각형 형태일 수 있으며, 바닥은 나노섬유로 이루어지고, 벽은 하이드로겔로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0035] 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드의 바닥은 나노섬유로 제한은 없으나, Polycaprolactone(PCL), polylactic-co-glycolic acid (PLGA), Polylactic acid (PLA) 등으로 이루어질 수 있고, 본 발명의 일 실시예에서는 PCL을 사용하였다. 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드의 벽은 하이드로겔로 제한은 없으나, Polyethylene glycol (PEG), hyaluronic acid (HA), alginate 등으로 이루어질 수 있고, 본 발명 일 실시예에서는 Polyethylene glycol (PEG)를 사용하였다.
- [0036] 본 발명에 의해 형성된 선 조직 유사 오가노이드는 200 μm 의 직경을 가지게 되는데 이러한 크기가 기능이 우수한 오가노이드 형성에 가장 효과적인 바, 본 발명의 방법이 오가노이드 및 질환모델 제작에 적합한 것이다.
- [0037] 바람직하게는, 상기 3차원 배양은 상기 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에 3 ~ 7일 동안 분화유도 배지를 이용하여 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 바람직하게는, 상기 선 조직 유사 오가노이드는 전구세포성 마커인 α -amylase, AQP5, E-cadherin 및 ZO-1의 발현이 증가된 것일 수 있으며, 세포간 밀착 결합을 통한 전구세포의 기능 강화로 세포 내 칼슘의 농도가 증가하고, 타액의 성분인 아밀라제를 분비하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 선 조직 유사 오가노이드 제작을 위해 사용할 수 있는 선 세포는 타액선, 간, 췌장, 신장과 같이 발생 기원이 유사한 선 장기 중 선택되는 1종일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 타액선 유래 세포를 사용하였다.
- [0040] 또한, 본 발명의 선 세포는 미분화 단계의 줄기세포나 분화가 일부 제한된 전구세포를 포함하며, 본 발명의 일 실시예에서는 타액선 줄기세포와 전구세포를 모두 사용하였다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 형성된 선 조직 유사 오가노이드에 방사선을 조사하는 단계를 포함하는 타액선 기능 저하 질환 모델 구축방법을 제공한다.
- [0042] 바람직하게는, 상기 방사선 조사는 10 내지 20Gy의 방사선을 조사할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 바람직하게는, 상기 타액선 기능 저하 질환은 구강건조증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 구축된 타액선 기능 저하 질환 모델을 제공한다.
- [0045] 또한, 본 발명은 상기 타액선 기능 저하 질환 모델에 후보약물을 접촉시키는 단계; 및 대조군과 비교하여 상기 후보약물의 타액선 기능 저하 완화 정도를 판단하는 단계를 포함하는 타액선 기능 저하 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0046] 바람직하게는, 상기 타액선 기능 저하 질환은 구강건조증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0048] “타액(saliva)”은 이하선, 악하선, 설하선 및 구강점막에 존재하는 점액선 등으로부터 분비되는 혼합액이다. 타액은 인체의 핵심 성분으로 타액선에서 생성되어 구강 내로 배출된다. 타액은 인체의 필수 성분으로서, 생체 활성단백질, 소화효소, 점액, 면역글로불린, 각종 염류 등이 포함되어 있다.
- [0049] 타액은 구강 내 건강뿐만 아니라 인체의 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 수행한다. 예를 들어 타액의 주요 성분인 뮤신(mucin), 면역글로불린 등은 외부의 감염으로부터 1차적인 방어 역할을 수행하며, 구강 및 치아의 윤활 및 수분 유지, pH 중화 기능을 통하여 구강점막 및 치아를 보호한다. 뿐만 아니라 타액에는 프티알린(ptyalin) 등의 아밀라아제(amylase)와 같은 소화 효소들이 있어 전분을 말토오스 단위까지 분해하는 등 소화를 촉진시키는 기능을 담당한다. 또한 타액의 분비에 의하여 인체의 수분대사 및 체온 조절이 이루어질 수 있으며, 유독물(I, Hg, Pb 등)을 배설하기도 한다.
- [0050] “타액선(침샘, salivary gland)”은 타액을 생성, 분비하는 기관으로 이하선(귀밑샘, parotid gland), 악하선(턱밑샘, submaxillary gland), 설하선(혀밑샘, sublingual gland)과 같은 주타액선(major salivary gland)과, 점액선(mucous gland)과 같이 구강점막(mucous membrane of oral cavity)에 존재하는 점액선(mucous gland)과 같이 구강점막의 여러 부위에 분포하는 소타액선(minor salivary gland)으로 분류된다.
- [0051] “구강건조증(xerostomia)”은 입이 마른다고 느끼는 주관적인 증상을 일반적으로 의미한다. 구강건조증은 객관적인 타액분비의 저하를 동반하는 경우가 많고, 타액의 성분에 변화가 있어도 그 증상이 유발된다고 알려져

있다.

[0052] 일반적으로 성인은 하루에 1~1.5L의 타액이 분비되며, 정상적인 타액의 양은 자극이 없을 때는 분당 0.3~0.4ml, 자극이 있을 때는 분당 1.5~2.0 ml가 분비되어야 한다. 통상적으로 타액의 분비가 50% 이상 감소된 환자의 경우 구강건조증의 증상이 나타난다고 알려져 있다. 또한 입으로 숨을 쉬면서 입 안의 수분이 증발되면 주관적으로 구강의 건조함을 느낄 수 있다. 타액분비의 저하를 가지고 있는 구강건조증 환자들은 구강점막에서 흡수되는 타액의 양과 구강에서 증발되는 타액의 양을 합친 것보다 타액이 적게 분비될 때 보통 진단이 되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 통상적으로 자극 시 분당 0.5~0.7ml 이하 또는 비자극시 분당 0.1ml 이하의 타액이 분비되는 경우에 “타액분비저하증 (hyposalivation)” 으로 정의한다.

[0053] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "후보약물"이란 타액선 기능 저하 질환에 대한 치료효과가 있는 것으로 예상되어, 치료 효과를 측정하기 위한 실험대상으로 사용될 수 있는 모든 물질을 의미하며, 실험모델에 적용할 수 있고 치료 효과를 측정할 수 있으면 천연물질 또는 그로부터 얻어진 것이든, 인공적으로 합성된 것이든 제한되지 않고, 그 종류도 제한되지 않는다.

[0054] 본 발명에 있어서, "오가노이드(organoid)"란 조직에서나 혹은 배아줄기세포에서 유래된 세포를 이용하여 이를 3D 형태로 배양을 하여 마치 인공장치와 같은 형태로 만들 수 있는 것을 의미한다. 오가노이드는 장기의 ‘organ’ 과 같은 의미를 가진 접미어로 ‘장기와 유사한 것’ 이라는 말을 지니고 있다. 오가노이드는 3차원 배양 방법을 통하여 세포와 세포의 기능이 좀 더 잘 배열되고, 기능성을 가지는 기관 같은 형태와 기능을 지닌다. 오가노이드는 줄기세포연구와 3D 세포배양 등이 개발되고, 다양한 조직으로 분화시킬 수 있는 생장 및 분화 인자의 최적화 연구와 함께 주목을 받고 있다.

[0055] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0056] <실시예 1> 타액선 전구세포의 선 조직 유사 오가노이드 형성 방법

[0057] 1. 사람 선 전구세포의 분리 및 오가노이드 형성

[0058] 타액선 조직에서 포스페이트-완충 식염수(phosphate-buffered saline: PBS)로 세척 후에 잘게 조각을 내었다. 타액선 조직의 조각을 콜라게나아제 타입 1 용액에서 37℃, 1 시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 시킨 조직을 2차원 배양하여, KSFM 배지(Keratinocyte serum free medium)에서 분리 및 배양하여 광학현미경(microscopy)으로 사람의 타액선 전구세포를 관찰하였다. 전구세포를 3차원 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 배양한 후에 형성되는 오가노이드를 크기 측정 및 면역염색, Real-time PCR, western blotting, 오가노이드의 기능 분석을 실시하였다 (도 1).

[0059] 2. 형성된 오가노이드의 세포 형태 및 증식

[0060] 전구세포를 3차원 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 배양한 후에 형성되는 오가노이드를 광학현미경(microscopy) 및 LIVE/DEAD kit를 이용하여 관찰하였다. Calcein AM (calcein acetoxymethyl ester)과 ethidium homodimer-1 사용하여 오가노이드 형태가 유지되는 것을 광학현미경과 LIVE/DEAD 염색법을 통한 이미지를 통해 확인할 수 있었다 (도 1).

[0061] 3. 면역형광 염색법

[0062] 면역형광 염색법은 4% 파라포름 알데하이드 용액에서 세포를 고정 후, 0.01% 트리톤 x-100 용액을 상온에서 10 분간 처리한 후 세포 표면에 구멍을 내어준다. 막을 PBS 내 1% 보바인 세럼으로 실온에서 1시간 동안 차단시키고 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다. anti-α-amylase, anti-ZO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Occludin (Thermo Scientific, San Diego, CA, USA) or anti-AQP5 (Alomone Lab, Jerusalem, Israel), anti-E-cadherin (BD Bioscience, Bedford, MA, USA), and anti-F-actin (Abcam, Cambridge, MA, USA) PBS로 상온에서 5분씩 세번 세척한 후, 각 1차 항체에 상응하는 형광-접합된 2차 항체들과 함께 배양하였으며, PBS로 상온에서 5분씩 세 번 세척 후, 핵을 염색하기 위해 DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)로 상온에서 5분간 염색하였다. Slide glass에 fluorescence가 fade되는 것을 막아주는 mounting solution을 떨어뜨려 mounting을 한 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 오가노이드의 형태가 유지되고, Amylase, AQP5, ZO-1, Occludin, E-cadherin and F-actin의 형광 발현정도가 증가된 것을 보였다 (도 1).

[0063] 4. 3차원 배양을 통해 형성된 오가노이드의 특성 분석을 위해 실시간 PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

[0064] Real-time PCR을 위해서 수거된 세포를 세포 용해 용액 (Trizol solution)을 처리한 후 완전히 용액 상태로 제작한다. 클로로포름 0.2ml 을 처리하여 15초간 뒤섞은 뒤 15분 동안 상온에서 방치하였다. 12,000rpm 으로 15분간 4℃에 원심분리한 뒤 투명한 층만 뽑아 80% 이소프로판올을 동량 처리하고 4℃에서 10분 동안 방치 후 다시 원심 분리하였다. 상층액 제거 후 1ml 75% 에탄올에 넣어 4℃, 3분 정도 방치 후 다시 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤 공기 중에 10분간 건조하였다.

[0065] RNA 1 μ l에 SYBR Green I을 이용하는 ABI PRISM 7000 서열 검출 시스템 상에서 실시간 PCR (real-time PCR)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 결정하였다. PCR 반응은 5 μ M cDNA, 10 μ M SYBR Green PCR master mix, 및 반응 당 20 μ M 의 최종 부피에 대하여 10 pM의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 수행하였다(도 2). 사용된 센스 및 안티센스 프라이머 서열은 다음과 같다(표 1). 전구세포를 3차원 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 배양한 후 형성된 오가노이드를 Real-time PCR을 통해 분석을 실시하였다. 형성된 오가노이드의 amylase, AQP5 등 전구세포의 마커가 유의적으로 증가함을 Real-time PCR으로 확인하였다(도 2).

표 1

[0066] α -Amylase (AMY1A)	F	CATTGACATTGGCGTAGCAG
	R	CAGAATGTCAAGATGGATGC
Aquaporin 5 (AQP5)	F	CTCTGCATCTTCTCCTCCACG
	R	TCCTCTCTATGATCTTCCCAG
Integrin β 1 (CD29)	F	GAAGGGTTGCCCTCCAGA
	R	GCTTGAGCTTCTCTGCTGTT
CD90 (Thy-1)	F	GACAGCCTGAGAGGGTCTTG
	R	CCCAGTGAAGATGCAGGTTT
Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)	F	AGGATCTGGTGAGCCTGAGAA
	R	CATAAGTGATGCTGGAGCTGGTAA
POU5F1(OCT4)	F	CTTGATCCTCGGACCGGCTA
	R	GGTTGCCTCTCACTCGGTTCT
Nanog	F	TGCAGCACAAGAAAGACCAC
	R	GCCACATGAAAGGTCTCCAT

[0067] 5. 웨스턴 블랏 분석을 통한 선세포 마커 확인

[0068] 먼저 세포 용해물 (30 μ g)로부터 단백질을 시료를 분리하고, 이를 환원 완충액과 함께 혼합, 가열하고 10% SDS-PAGE 겔상에 옮긴 후, 전자염색 (electroblotting) 방법을 사용하여 단백질을 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (polyvinylidene difluoride) 막으로 이동시켰다. 막을 TBS 내 5% wt/vol 무지방 분유로 실온에서 30분 동안 차단시키고, 항원에 대한 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다: α -amylase, AQP5, ZO-1, CK7, CK18 and β -actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); E-cadherin (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). PBS, 트윈 20 으로 블랏을 세척한 후, 블랏들을 각 1차 항체에 상응하는 호스라디쉬 페록시다아제-접합된 2차 항체들과 함께 배양하였으며 이후 강화된 화학발광검출 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)을 수행하였다. 양성 면역반응성 밴드들이 농도계에 의해서 정량화되었으며, 사람 β -actin의 발현과 비교분석하였다. 형성된 오가노이드의 Amylase, AQP5, E-cadherin, ZO-1, CK7, CK18의 발현정도가 증가된 것을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다(도 2).

[0069] 6. 오가노이드의 기능 평가: α -amylase 활성 측정

[0070] 형성된 오가노이드의 기능을 측정하기 위해서 아밀레이즈 활성도를 측정하였다. 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 배양한 오가노이드의 배양액을 모아서 α -amylase activity assay kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 활성도를 측정하였다. 3차원 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 형성된 오가노이드는 아밀레이즈 많이 생성하는 것을 확인하였다 (도 2).

[0071] 7. 오가노이드의 기능 평가: 세포 내 칼슘 측정

[0072] 형성된 오가노이드의 기능을 측정하기 위해서 오가노이드에서 세포 내 칼슘을 Fluo-4AM (Molecular Probe, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 형성된 오가노이드에 Fluo-4AM를 넣고 37℃에서 1시간 동안 염색한 후 칼슘 indicator ATP (adenosine triphosphate, 100 μ M), TG (thapsigargin, 1 μ M) and CChol

(Carbachol, 10 μ M) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 를 넣어서 라이브하게 형광현미경으로 형광값을 측정하였다. 3차원 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드에서 형성된 오가노이드는 정상적으로 칼슘을 분비하는 것을 확인하였다(도 2).

[0073] <실시예 2> 타액선 줄기세포의 선 조직 유사 오가노이드 형성 방법

[0074] 1. 사람 선 줄기세포의 분화

[0075] (1) 연골세포분화: 우태혈청이 포함되지 않은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 2×10^5 개의 세포수로 15 mL polypropylene tube에 넣은 후 원심 분리하여 펠렛을 얻었으며 6주간 분화 배양하였다. 연골세포 분화배지는 10 ng/mL TGF- β 3, dexamethasone, 50 g/mL ascorbic acid, 40 g/mL proline, 100 g/mL pyruvate (Sigma) 그리고 50 mg/mL ITS+ Premix (Becton Dickinson)를 포함하는 DMEM 배지를 사용하여 연골세포분화를 하였다(도 3).

[0076] (2) 지방세포분화: 중간엽 줄기세포 1×10^5 개를 12 well plate에 분주하여 하루 동안 배양한 후 1 mL의 지방분화유도배지 (10% FBS, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX, 200 μ l indomethacin을 포함하는 α -MEM에서 7일간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 고정 및 세척 후 Oil Red O (Sigma) 용액으로 세포를 염색하였으며 광학 현미경하에서 지질적화 형성을 관찰하였다(도 3).

[0077] (3) 골세포 분화: 중간엽 줄기세포 1×10^5 개를 12 well plate에 분주하여 하루동안 배양한 후 1 mL의 골분화유도배지 (10% FBS, 0.1 μ M dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, 0.5 mM ascorbate-2-phosphate를 포함하는 α -MEM에서 2주간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 고정 및 세척 후 Alizarin Red S (Sigma) 용액으로 세포를 염색하였으며 광학 현미경 하에서 석회화 결절 형성을 관찰하였다 (도 3).

[0078] (4) 전구세포분화: 선 줄기세포를 1×10^5 개를 매트릭젤로 코팅한 6 well plate에 분주하여 Hepato-STIMs 배지에서 배양한다. 분화 배지 (Hepato-STIMs, 2mM L-glutamine, 1% PS, 20ng/ml EGF)에서 3 일간 분화를 유도함으로써, 타액선 전구세포의 특징을 관찰하였다(도 3).

[0079] (5) 간세포분화: 줄기세포를 30 mm dish에 mm² 당 5×10^4 세포로 seeding하고 세포가 85% 이상 자라면 Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) 배지로 교환한 후 48시간 배양한다. 분화 배지 (DMEM, 40% MCDB201, 2% FBS, 1X PS, 20ng/ml HGF, 10ng/ml FGF)에서 7일 혹은 14일간 분화를 유도함으로써, 간세포의 형태와 유사한 입방(cuboidal) 형태의 세포로 분화 및 성숙을 광학 현미경 하에서 관찰하였다(도 3).

[0080] 2. 3차원 배양을 통해 선 줄기세포를 전구세포로 분화

[0081] 선 줄기세포의 3차원 오가노이드를 유도하는 것을 특징으로, 사람 타액선 조직으로부터 분리된 선 줄기세포를 200 μ m 일정한 사이즈의 오가노이드가 형성되도록 나노섬유 기반의 마이크로 영역과 세포의 부착이 일어나지 않는 하이드로젤 기반의 마이크로 영역으로 구성된 스케폴드 (이하 마이크로패턴화 된 나노섬유 스케폴드)에서 3 일간 다른 성장인자를 첨가하지 않고, Hepato-STIM (항생제)를 포함하는 분화 배지에 배양하여 광학현미경 (microscopy)으로 오가노이드를 관찰하였다(도 3).

[0082] 3. 3차원 배양을 통해 분화된 세포의 특성 분석을 위해 실시간 PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

[0083] Real-time PCR을 위해서 수거된 세포를 세포 용해 용액 (Trizol solution)을 처리한 후 완전히 용액 상태로 제작한다. 클로로포름 0.2ml 을 처리하여 15초간 뒤섞은 뒤 15분 동안 상온에서 방치하였다. 12,000rpm 으로 15분 간 4°C에 원심분리한 뒤 투명한 층만 뽑아 80% 이소프로판올을 동량 처리하고 4°C에서 10분 동안 방치 후 다시 원심 분리하였다. 상층액 제거 후 1ml 75% 에탄올에 넣어 4°C, 3분 정도 방치 후 다시 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤 공기 중에 10분간 건조하였다.

[0084] RNA 1 μ l에 SYBR Green I을 이용하는 ABI PRISM 7000 서열 검출 시스템 상에서 실시간 PCR (real-time PCR)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 결정하였다. PCR 반응은 5 μ M cDNA, 10 μ M SYBR Green PCR master mix, 및 반응 당 20 μ M 의 최종 부피에 대하여 10 pM의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 수행하였다(도 4). 사용된 센스 및 안티센스 프라이머 서열은 상기 표 1과 같다. 3차원 정사각형 형태의 배양용 스케폴드에서 배양한 선 줄기세포를 Real-time PCR을 통해 분석을 실시하였다. 2차원 분화 방법에 비해 3D 오가노이드를 통한 분화 방법을 사용하였을 때 amylase, AQP5 등 전구세포의 마커가 유의적으로 증가함을 Real-time PCR으로 확인하였다

(도 4).

[0085] 4. 면역형광 염색법

[0086] 면역형광 염색법은 4% 파라포름 알데하이드 용액에서 세포를 고정 후, 0.01% 트리톤 x-100 용액을 상온에서 10 분간 처리한 후 세포 표면에 구멍을 내어준다. 막을 PBS 내 1% 보바인 세럼으로 실온에서 1시간 동안 차단시키고 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다. anti- α -amylase, anti-ZO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Occludin (Thermo Scientific, San Diego, CA, USA) or anti-AQP5 (Alomone Lab, Jerusalem, Israel) PBS로 상온에서 5분씩 세 번 세척한 후, 각 1차 항체에 상응하는 형광-접합된 2차 항체들과 함께 배양하였으며, PBS로 상온에서 5분씩 세 번 세척 후, 핵을 염색하기 위해 DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)로 상온에서 5분간 염색하였다. Slide glass에 fluorescence가 fade되는 것을 막아주는 mounting solution을 떨어뜨려 mounting을 한 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 2차원 분화 방법에 비해 3D 오가노이드를 통한 분화 방법을 사용하였을 때 Amylase, AQP5, ZO-1 및 Occludin의 형광 발현정도가 증가된 것을 보였다(도 4).

[0087] 5. 웨스턴 블랏 분석을 통한 선세포 마커 확인

[0088] 먼저 세포 용해물 (30 μ g)로부터 단백질을 분리하고, 이를 환원 완충액과 함께 혼합, 가열하고 10% SDS-PAGE 겔상에 옮긴 후, 전자염색 (electroblotting) 방법을 사용하여 단백질을 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (polyvinylidene difluoride) 막으로 이동시켰다. 막을 TBS 내 5% wt/vol 무지방 분유로 실온에서 30분 동안 차단시키고, 항원에 대한 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다: α -amylase, AQP5, ZO-1, CK7, CK18 and β -actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); E-cadherin (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). PBS, 트윈 20 으로 블랏을 세척한 후, 블랏들을 각 1차 항체에 상응하는 호스래디쉬 페록시다아제-접합된 2차 항체들과 함께 배양하였으며 이후 강화된 화학발광검출 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)을 수행하였다. 양성 면역반응성 밴드들이 농도계에 의해서 정량화되었으며, 사람 β -actin의 발현과 비교분석하였다. 2차원 분화 방법에 비해 3D 오가노이드를 통한 분화 방법을 사용하였을 때 Amylase, AQP5, ZO-1 및 E-cadherin의 발현정도가 증가된 것을 보였다(도 4).

[0089] <실시예 3> 3차원 오가노이드 형성 기반 타액선 기능 저하 질환모델 제작 방법

[0090] 전구세포로 3차원 오가노이드를 형성한 후, 방사선을 농도와 시간에 따라 조사하여 광학현미경(microscopy), 면역염색, Real-time PCR, 웨스턴 블랏으로 오가노이드의 형태 기능을 확인하였다(도 5).

[0091] 1. 형성된 오가노이드의 세포 형태

[0092] 전구세포를 3차원 오가노이드를 형성한 후에 방사선을 농도와 시간에 따라 조사하여 광학현미경(microscopy) 이용하여 관찰하였다. 방사선 조사 농도와 시간에 따라서 오가노이드의 형태가 깨지는 것을 확인하였다 (도 5).

[0093] 2. 면역형광 염색법

[0094] 면역형광 염색법은 4% 파라포름 알데하이드 용액에서 세포를 고정 후, 0.01% 트리톤 x-100 용액을 상온에서 10 분간 처리한 후 세포 표면에 구멍을 내어준다. 막을 PBS 내 1% 보바인 세럼으로 실온에서 1시간 동안 차단시키고 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다. anti- α -amylase, anti-ZO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Occludin (Thermo Scientific, San Diego, CA, USA) or anti-AQP5 (Alomone Lab, Jerusalem, Israel), anti-E-cadherin (BD Bioscience, Bedford, MA, USA), and anti-F-actin (Abcam, Cambridge, MA, USA) PBS로 상온에서 5분씩 세 번 세척한 후, 각 1차 항체에 상응하는 형광-접합된 2차 항체들과 함께 배양하였으며, PBS로 상온에서 5분씩 세 번 세척 후, 핵을 염색하기 위해 DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)로 상온에서 5분간 염색하였다. Slide glass에 fluorescence가 fade되는 것을 막아주는 mounting solution을 떨어뜨려 mounting을 한 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 방사선 조사 농도와 시간에 따라서 오가노이드의 형태가 깨지면서, Amylase, AQP5, ZO-1, Occludin, E-cadherin and F-actin의 형광 발현정도가 감소된 것을 보였다(도 5).

[0095] 3. 방사선 조사 후 3차원 배양을 통해 형성된 오가노이드의 특성 분석을 위해 실시간 PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

[0096] Real-time PCR을 위해서 수거된 세포를 세포 용해 용액 (Trizol solution)을 처리한 후 완전히 용액 상태로 제작한다. 클로로포름 0.2ml 을 처리하여 15초간 뒤섞은 뒤 15분 동안 상온에서 방치하였다. 12,000rpm 으로 15분간 4℃에 원심분리한 뒤 투명한 층만 뽑아 80% 이소프로판올을 동량 처리하고 4℃에서 10분 동안 방치 후 다시

원심 분리하였다. 상층액 제거 후 1ml 75% 에탄올에 넣어 4℃, 3분 정도 방치 후 다시 원심분리하고 상층액을 제거한 뒤 공기 중에 10분간 건조하였다.

[0097] RNA 1 μ l에 SYBR Green I을 이용하는 ABI PRISM 7000 서열 검출 시스템 상에서 실시간 PCR (real-time PCR)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 결정하였다. PCR 반응은 5 μ M cDNA, 10 μ M SYBR Green PCR master mix, 및 반응 당 20 μ M 의 최종 부피에 대하여 10 pM의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 수행하였다 (도 6). 사용된 센스 및 안티센스 프라이머 서열은 상기 표 1과 같다. 방사선 조사 농도와 시간에 따라서 오가노이드의 형태가 깨지면서 amylase, AQP5 등 전구세포의 마커가 유의적으로 감소함을 Real-time PCR으로 확인하였다(도 6).

[0098] 4. 웨스턴 블랏 분석을 통한 선세포 마커 확인

[0099] 먼저 세포 용해물 (30 μ g)로부터 단백질을 분리하고, 이를 환원 완충액과 함께 혼합, 가열하고 10% SDS-PAGE 겔상에 옮긴 후, 전자염색 (electroblotting) 방법을 사용하여 단백질을 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (polyvinylidene difluoride) 막으로 이동시켰다. 막을 TBS 내 5% wt/vol 무지방 분유로 실온에서 30분 동안 차단시키고, 항원에 대한 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다: α -amylase, AQP5, ZO-1, CK7, CK18 and β -actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); E-cadherin (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). PBS, 트윈 20 으로 블랏을 세척한 후, 블랏들을 각 1차 항체에 상응하는 호스라디쉬 페록시다아제-접합된 2차 항체들과 함께 배양하였으며 이후 강화된 화학발광검출 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)을 수행하였다. 양성 면역반응성 밴드들이 농도계에 의해서 정량화되었으며, 사람 β -actin의 발현과 비교분석하였다. 방사선 조사 농도와 시간에 따라서 오가노이드의 형태가 깨지면서 Amylase, AQP5, E-cadherin, ZO-1, CK7, CK18의 발현정도가 감소된 것을 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다 (도 6).

[0100] 5. 오가노이드의 기능 평가: α -amylase 활성 측정

[0101] 방사선을 농도와 시간에 따라 조사한 후, 오가노이드의 기능을 측정하기 위해서 아밀레이즈 활성도를 측정하였다. 3차원 오가노이드에 방사선을 조사하여 배양한 오가노이드의 배양액을 모아서 α -amylase activity assay kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 아밀레이즈 활성도를 측정하였다. 방사선 조사 농도와 시간에 따라서 오가노이드의 형태가 깨지면서 오가노이드는 아밀레이즈의 활성이 감소하는 것을 확인하였다(도 6).

[0102] 6. 오가노이드의 기능 평가: 세포 내 칼슘 측정

[0103] 방사선을 농도와 시간에 따라 조사한 후, 오가노이드의 기능을 측정하기 위해서 오가노이드에서 세포 내 칼슘을 Fluo-4AM (Molecular Probe, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 형성된 오가노이드에 Fluo-4AM를 넣고 37℃에서 1시간 동안 염색한 후 칼슘 indicator ATP (adenosine triphosphate, 100 μ M), TG (thapsigargin, 1 μ M) and CChol (Carbachol, 10 μ M) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣어서 라이브하게 형광현미경으로 형광값을 측정하였다. 방사선 조사 농도와 시간에 따라서 오가노이드의 형태가 깨지면서 오가노이드는 칼슘 분비가 감소하는 것을 확인하였다(도 6).

[0104] <실시예 4> 3차원 오가노이드 질환모델을 이용한 약물스크리닝 방법

[0105] 1. 방사선 조사 후 선 줄기세포의 공배양을 통한 3차원 오가노이드의 보호효과 확인

[0106] 3차원 오가노이드에 방사선을 조사, 선 줄기세포와 공배양을 한 후 광학현미경(microscopy) 및 LIVE/DEAD kit를 이용하여 3차원 오가노이드를 관찰하였다. Calcein AM (calcein acetoxymethyl ester)과 ethidium homodimer-1 사용하여 선 줄기세포와 공배양을 통해 3차원 오가노이드의 형태가 유지되고 보호되는 것을 광학현미경과 LIVE/DEAD 염색법을 통한 이미지를 통해 확인할 수 있었다(도 7).

[0107] 2. 세포 증식과 생존율 분석

[0108] 3차원 오가노이드에 방사선을 조사, 선 줄기세포와 공배양을 한 후, 배양된 세포를 대상으로 MTT 조사법과 트립판 블루 조사법 (Trypan blue assay)을 실시하여 세포생존율을 분석하였다. 방사선 조사 후 3차원 오가노이드에 형태가 유지되지 못하고 깨질 뿐만 아니라, 세포 증식율이 떨어지는 것을 확인하였다. 그러나 선 줄기세포와 공배양을 하였을 경우 세포의 형태 및 증식률이 증가되는 것 확인하였다(도 7).

[0109] 3. 활성인자 발현 확인: ELISA 분석법에 의한 다양한 활성인자 정량

[0110] 3차원 오가노이드와 간엽줄기세포 (MSCs)의 공배양을 통해 활성인자 발현을 측정하였다. 배양 3일후 배양액을 수거한 후 R&D Systems사의 EGF, FGF7, FGF10, HGF, IGF, VEGF 정량용 ELISA 키트를 사용하여 활성인자 양을

측정하였다. 3차원 오가노이드와 간엽줄기세포 (MSCs) 공배양 했을 경우 공배양을 하지 않았을 때 보다 활성인자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 7).

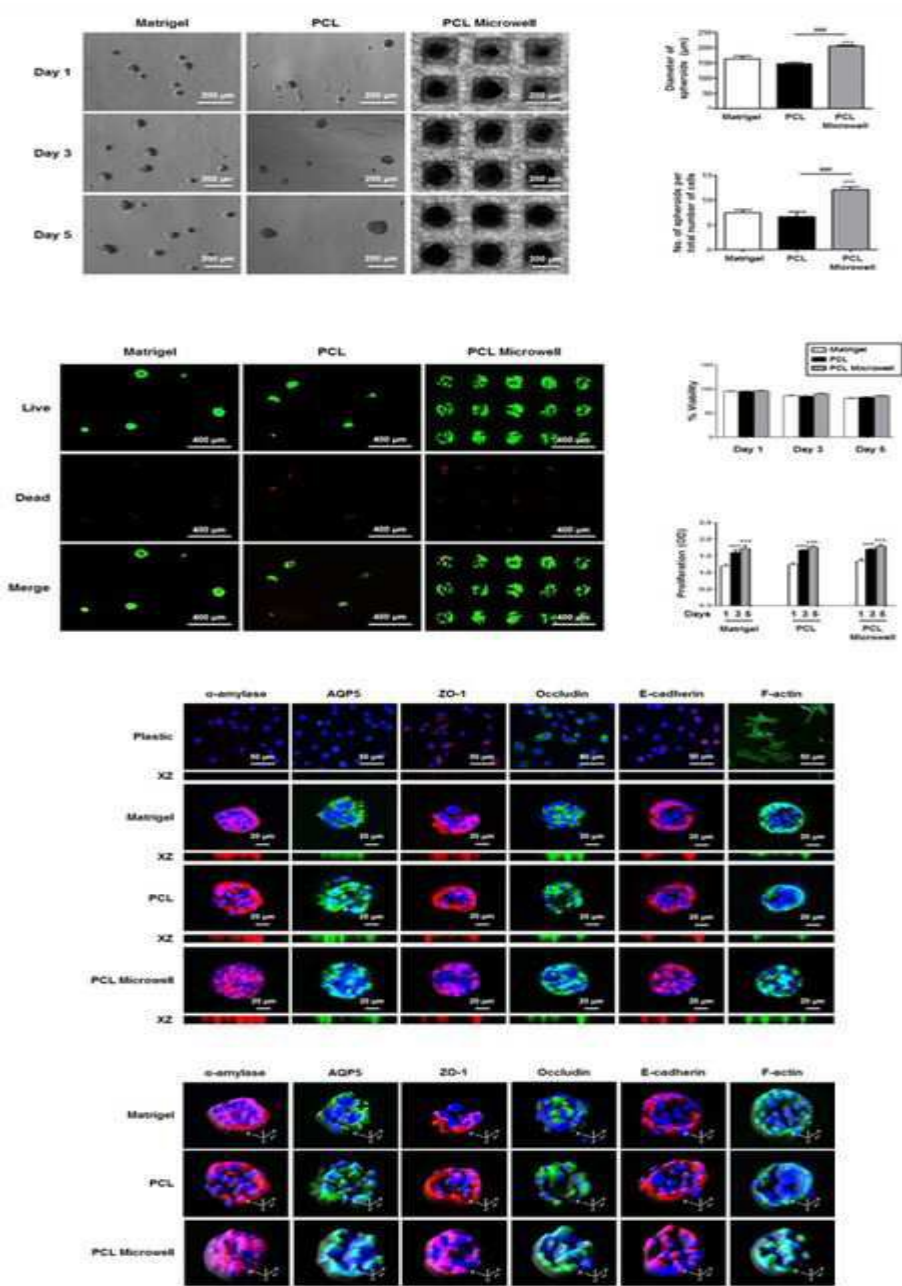
[0111] **4. Microarray를 통한 줄기세포 기능 강화 분석**

[0112] 구조 유전체학의 결과로 얻어진 모든 유전자들을 대표하는 DNA 조각 (PCR product 또는 oligo-DNA)을 준비하여 최종적으로 수용액 상태로 녹여 각각의 유전자를 384 well plate에 담아 준비한다. 여러 개 핀이 달려 있는 자동화된 제작기를 사용하여 광학 현미경용 슬라이드 유리판에 DNA들을 고밀도로 집적 시킨다. 이때 유리판은 화학적인 코팅을 하여 DNA가 잘 붙을 수 있도록 되어 있다. 핀의 끝부분은 펜촉과 같은 형태로 갈라져 있으며 이로 인해 모세관 현상으로 수용액으로 된 DNA를 머금게 된다. 그런 후 핀들은 자동화 시스템에 의해 유리판으로 다가가 바둑판 모양으로 질서정렬하게 DNA들을 심게 된다. 이후 일련의 프로세싱과정을 거쳐 DNA 마이크로어레이 (생화학적인 DNA 칩)가 완성된다. 현재 많이 사용하고 있는 Affymetrix사에서 개발한 Microarray 방법으로 실험을 진행하였다.

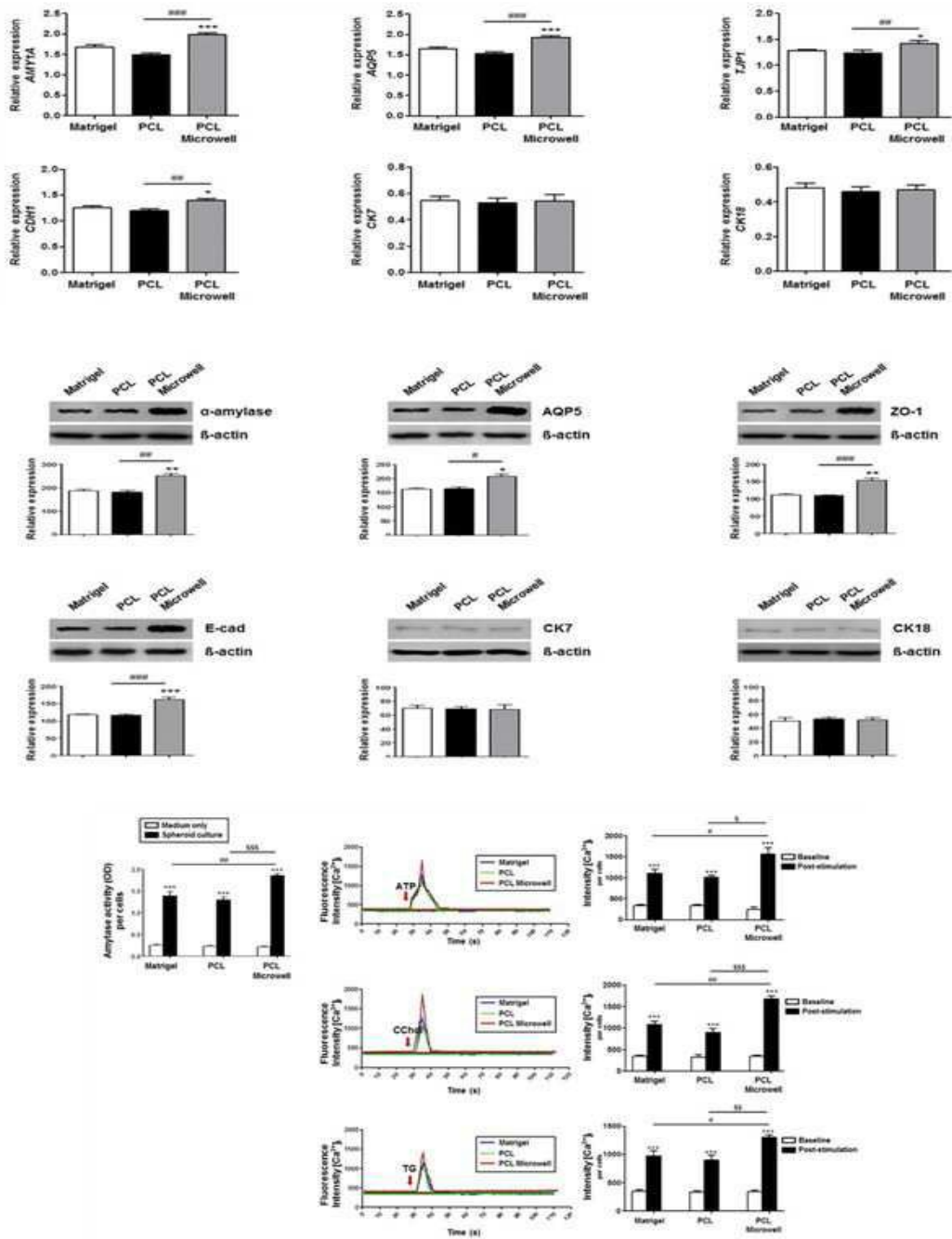
[0113] 마이크로어레이 실험은 유리판에 붙어 있는 수천 개의 해당유전자 probe 에 경쟁적으로 서로 결합 반응한 타겟 유전자량의 차이에 따라 나타나는 색상 변화에 의해 테스트 세포안의 순간의 유전자들의 발현 상태 (up or down-regulation)를 알 수 있다. 수천 수 만개의 유전자를 대상으로 그리고 여러 번의 다른 실험결과를 대상으로 원활한 데이터 분석을 위해서는 색상변화로 나타낸 유전자 발현 양상을 수치화 시켜 데이터베이스화 하였다. 입력된 데이터를 이용하여 전체 실험상에서 유전자 발현 (gene expression pattern)의 유사한 정도 (similarity)에 따라 유전자들을 그룹화 하였다. 이때 이용되는 방법은 주로 스탠다드 알고리즘을 응용한 clustering 방법을 사용하였고, clustering 분석방법의 가장 중요한 목적은 실험 간 또는 각 유전자들 간의 유사한 정도를 확인하였다 (도 7).

도면

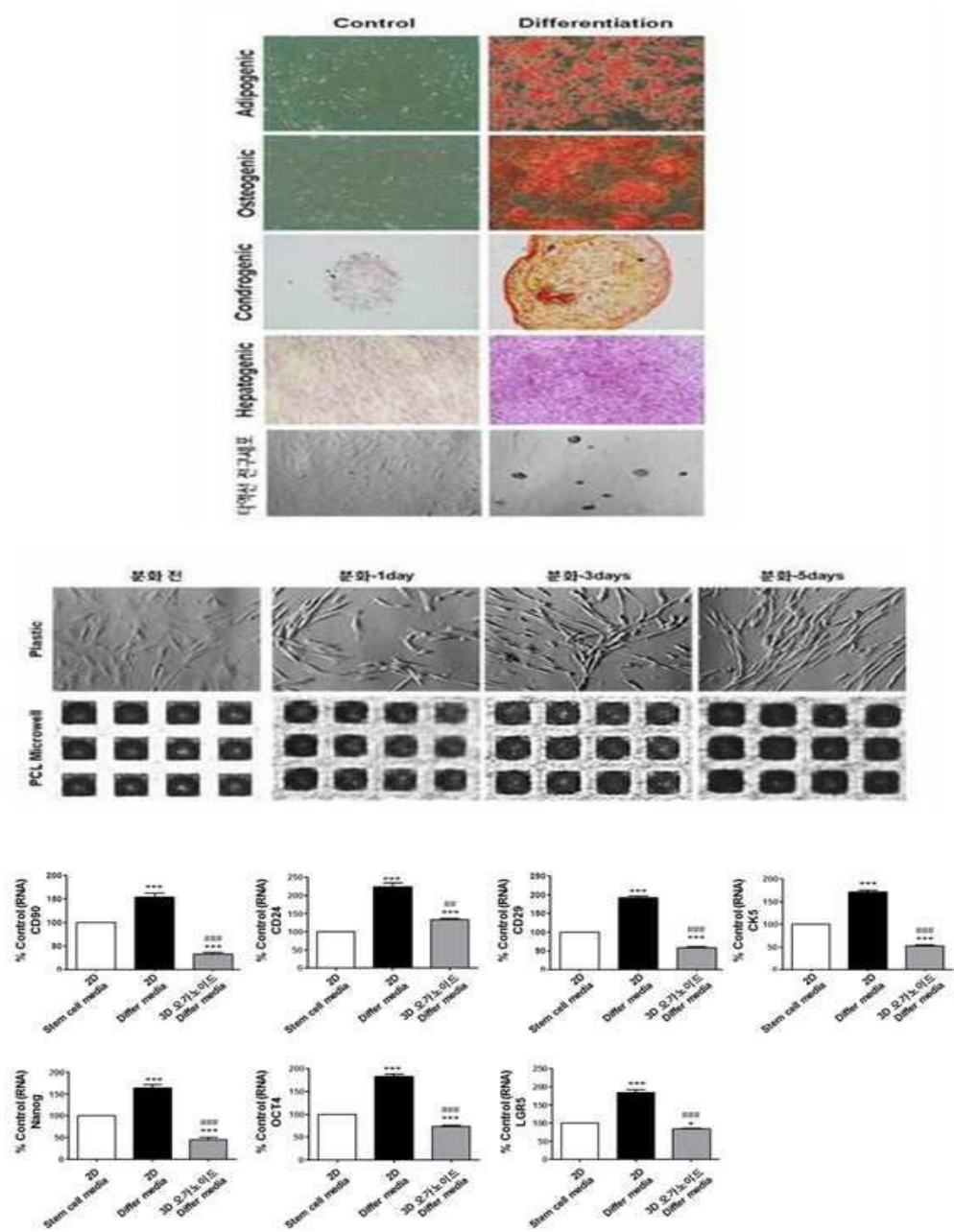
도면1



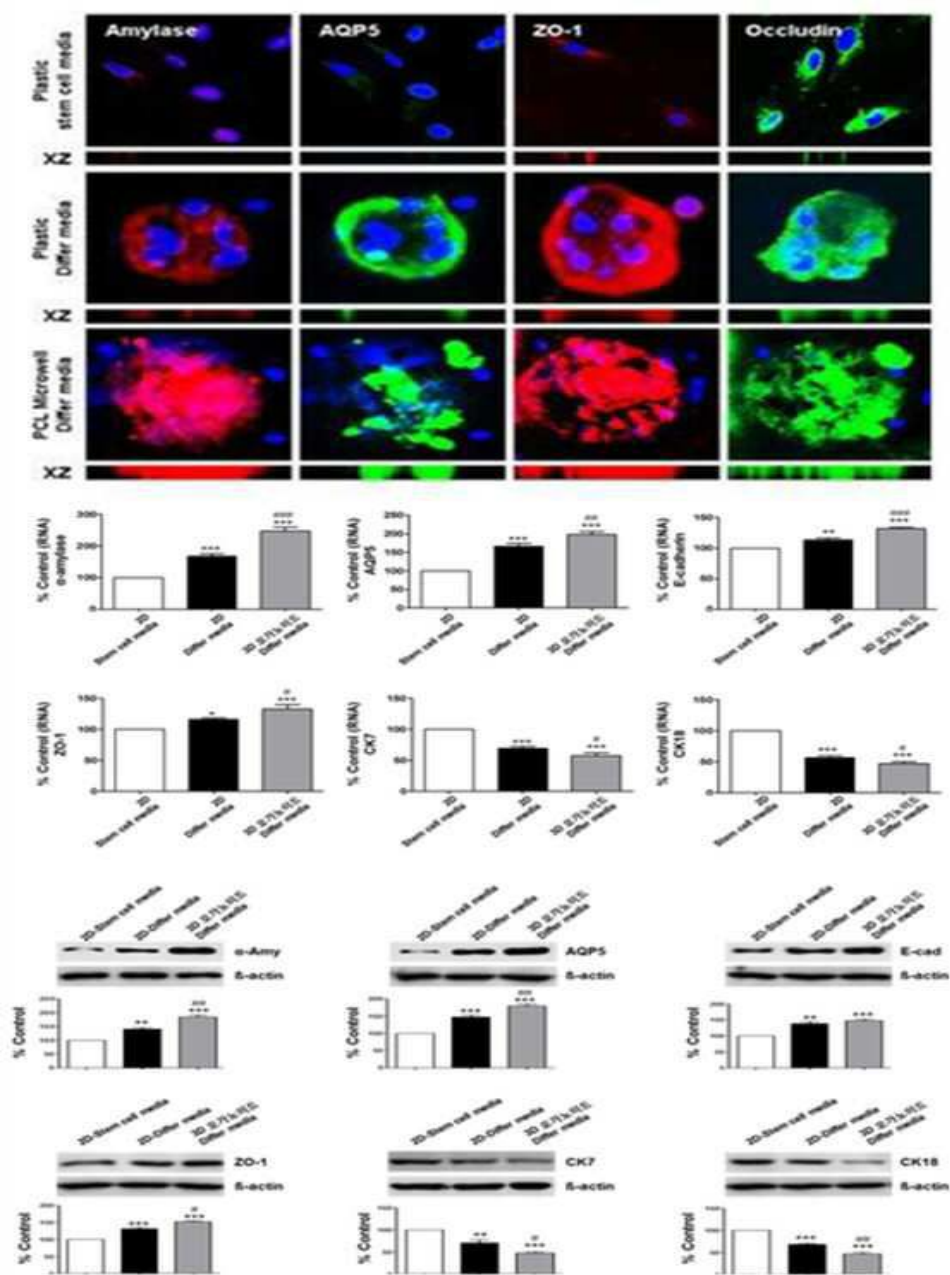
도면2



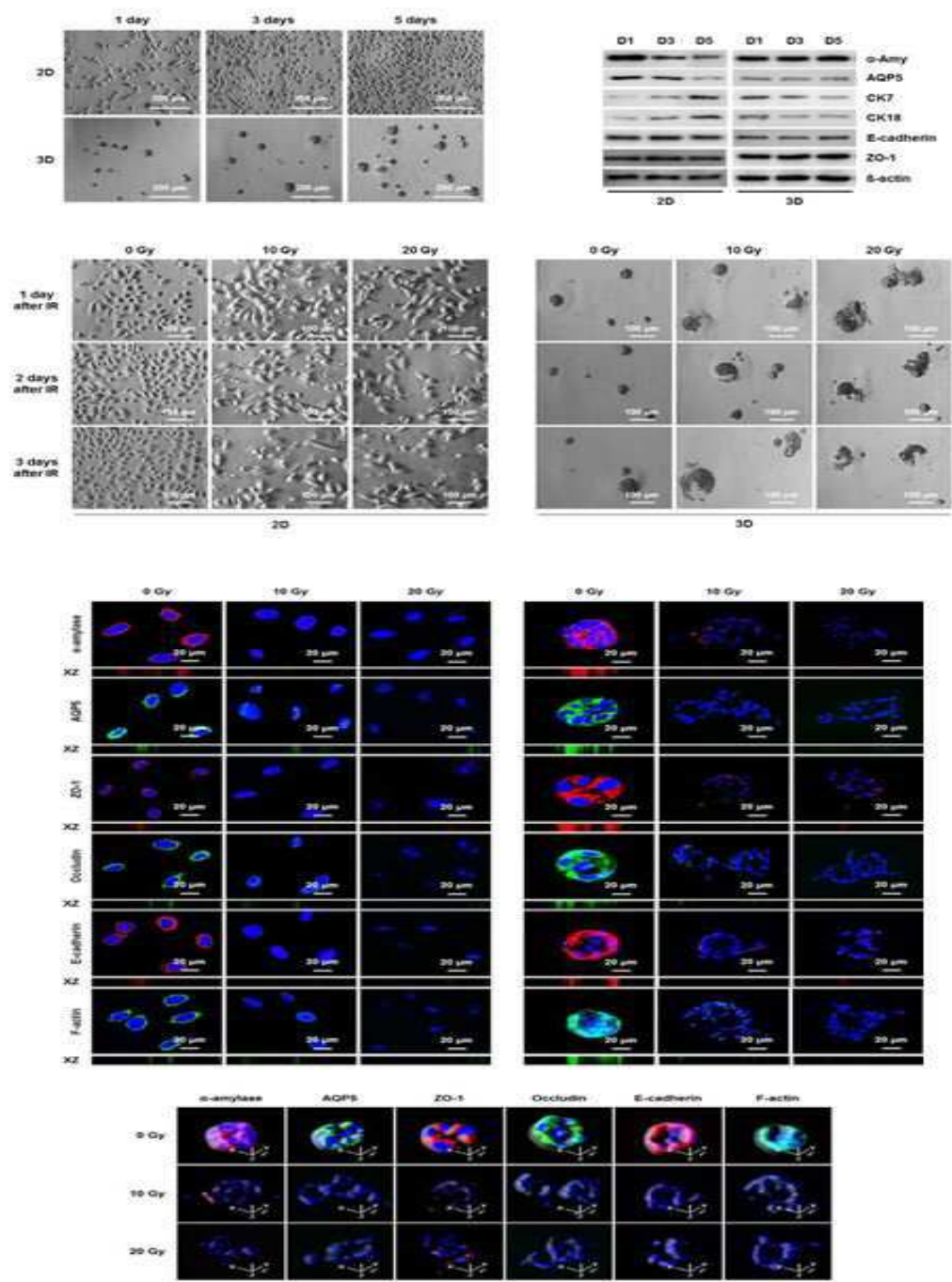
도면3



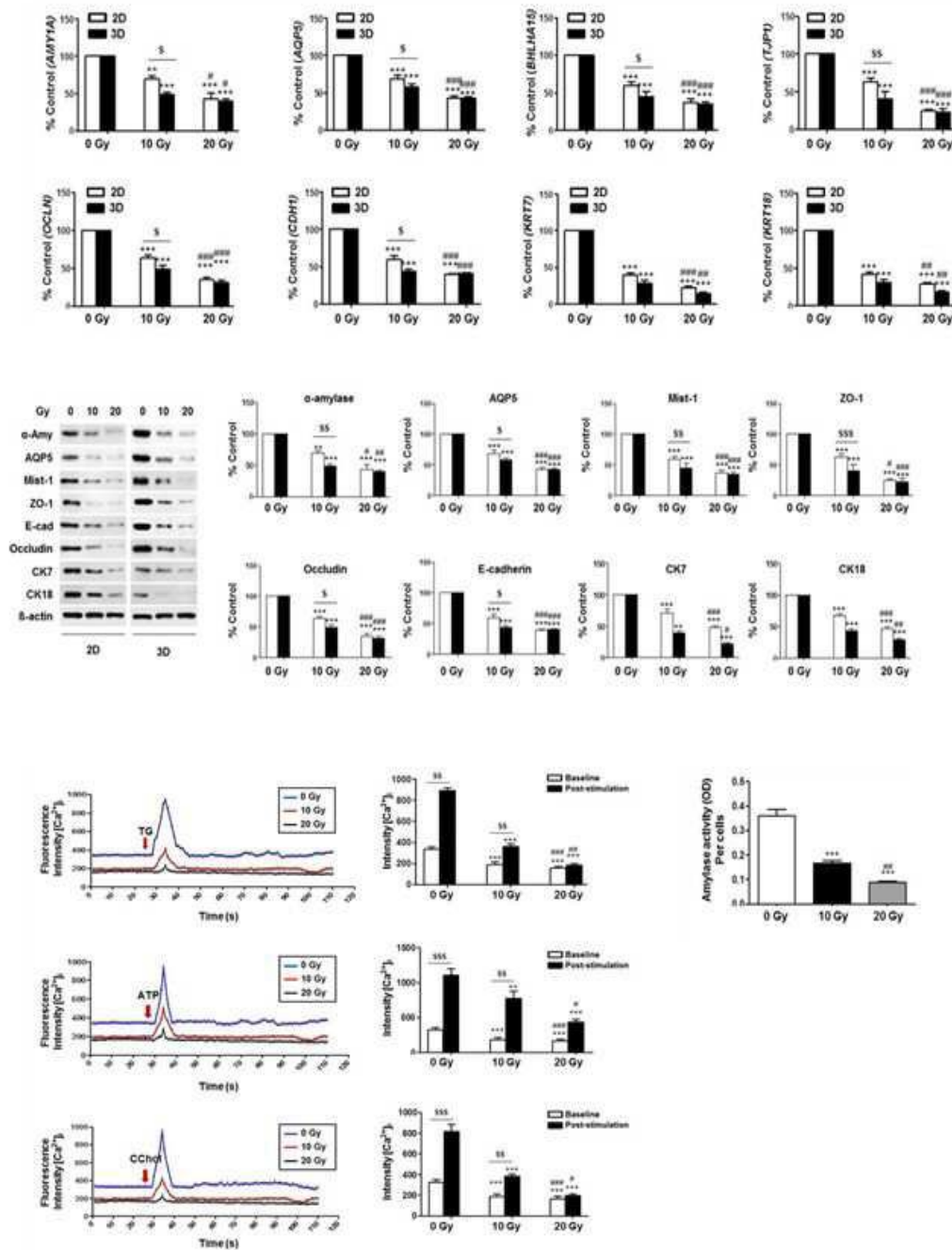
도면4



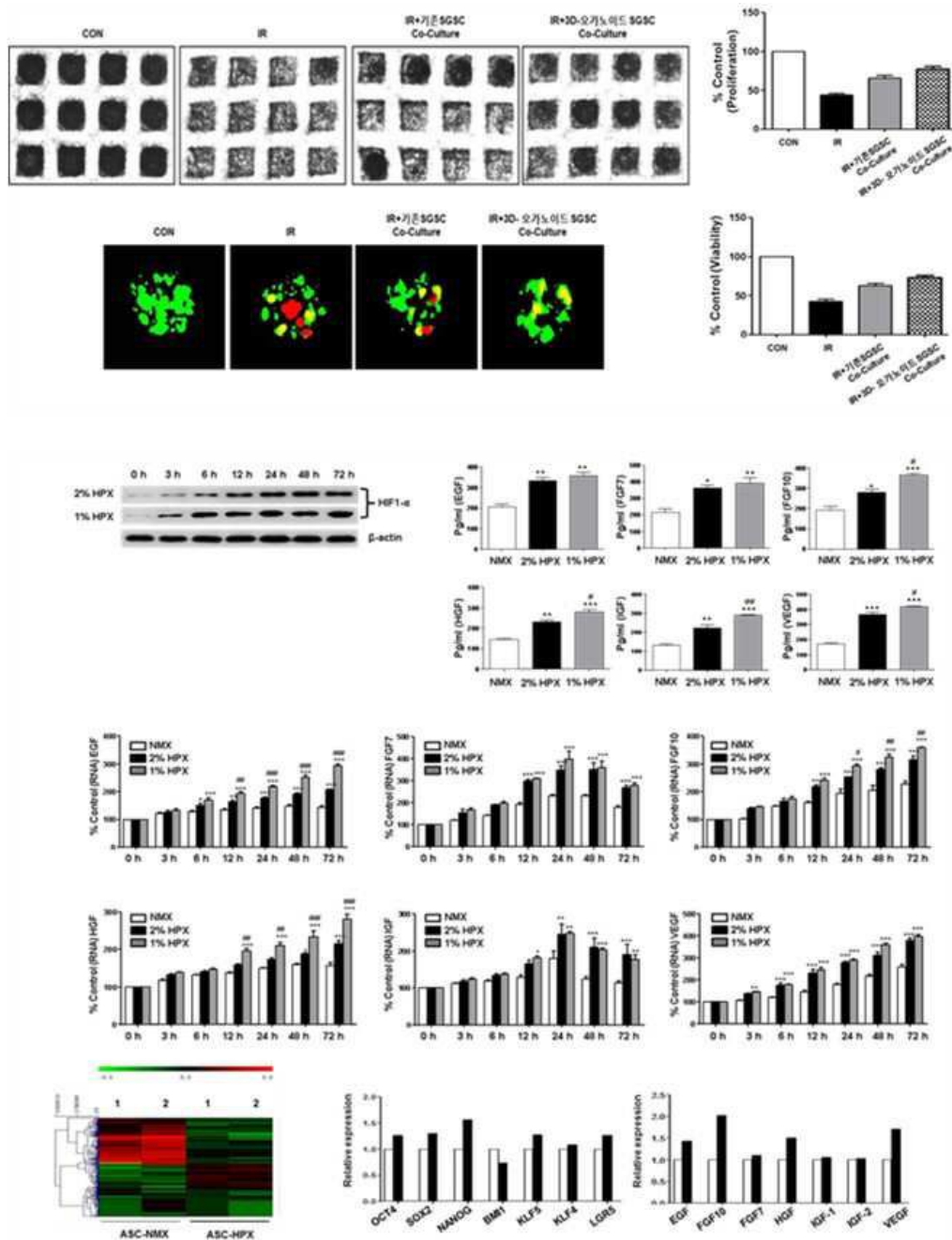
도면5



도면6



도면7



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

제1항 내지 제6항

【변경후】

제1항 내지 제4항, 제6항