(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0162775
(43) 공개일자 2024년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *C12N 5/071* (2010.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5088 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0059788
(22) 출원일자 2023년05월09일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35, 103-603 (한강로3가, 용산시티파크1단지)
박수정
서울특별시 마포구 성미산로 13길 102, 302호 (성산동)
(74) 대리인
특허법인에스알비

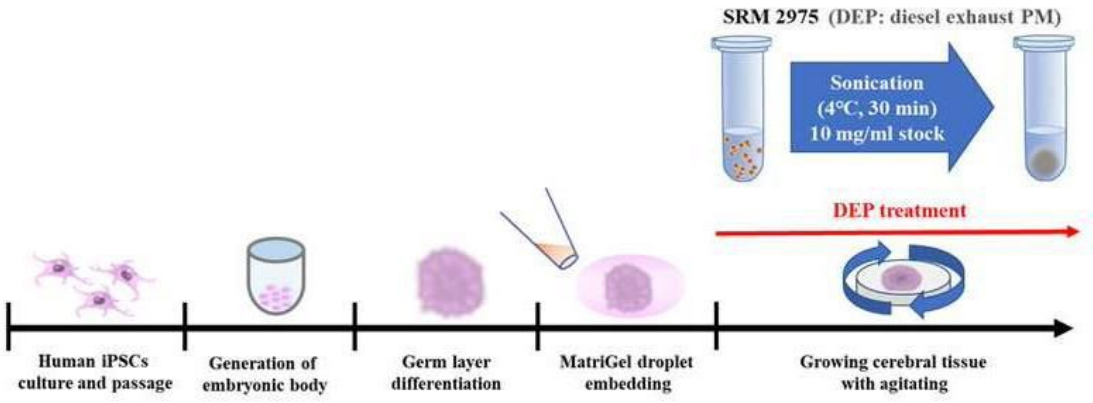
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **대뇌 오가노이드를 이용하는 뇌신경 독성물질 또는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 대뇌 오가노이드를 이용하는 뇌신경 독성물질 또는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상기 스크리닝 시스템을 활용하면 대기 오염물질을 비롯하여 일상생활에서 접하는 식품, 특히 나노칼슘과 같이 흡수 및 기능 향상을 위한 식품제형을 비롯하여 보관과 유통을 용이하게 하기 위한 식품첨가제, 보존제, 포장재 등에 포함되어 있는 나노물질이 뇌 신경조직과 시냅스 가소성에 미치는 영향을 평가할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711187608
과제번호 2022M3H4A1A01005271
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 나노소재기술개발
연구과제명 오가노이드 기반 약물 스크리닝용 나노바이오하이브리드 엑츄에이터 칩
기 여 율 1/3
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345354116
과제번호 2022R1I1A1A01069710
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 창의도전연구기반지원
연구과제명 초미세먼지의 영향 모니터링이 가능한 파킨슨병 환자세포 유래 시상-중뇌 어셈블로이드 체외 질병모델의 개발과 치료약물 스크리닝
기 여 율 1/3
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2022.06.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711198532
과제번호 RS-2023-00259341
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관협력허브구축
연구과제명 서강-유펜 신종 감염병 테라노스틱스 융합연구센터
기 여 율 1/3
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2023.07.01 ~ 2028.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법:

줄기세포를 부유배양하여 스페로이드(spheroid)를 형성하는 스페로이드 형성 단계;

상기 스페로이드를 비타민 A를 포함하지 않는 배지에서 배양하여 대뇌 오가노이드(Organoid)로 분화시키는 분화 단계;

상기 대뇌 오가노이드에 신경상피 버드(Neuroepithelial bud)가 형성되면 시험물질을 접촉시키는 접촉 단계;

상기 대뇌 오가노이드를 비타민 A를 포함하는 배지에서 배양하여 성장시키는 성장 단계; 및

상기 대뇌 오가노이드의 구조적 또는 기능적 손상의 발생 정도를 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군에 대비하여 비교하는 분석 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 유도만능 줄기세포(Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs), 인간 배아 줄기 세포(human embryonic stem cells, hESCs) 및 인간 전분화능 줄기세포(human Pluripotent Stem Cell; hPSC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분화 단계는 다음 단계를 포함하는 것인, 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법:

상기 스페로이드에 배엽층(germ layer)을 형성하는 배엽층 형성 단계; 및

상기 배엽층이 형성된 스페로이드를 마트리겔(MatriGel)로 포매하는 포매 단계.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 시험물질은 디젤 배기 입자(Diesel-exhaust Particulate Matters; DPM), 미세먼지(Particulate Matter; PM) 및 총먼지(Total suspended Particles; TSP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 성장 단계는 15일 내지 60일 동안 수행되는 것인, 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 구조적 손상 또는 기능적 손상은 대뇌 오가노이드의 조직 크기 20 내지 70% 감소, 뇌신경 조직 발현 마커(MAP2)의 발현량 감소, 염증 반응 관련 인자의 발현량 증가, 가바(GABA)-글루타메이트(Glutamate)의 발현 불균형, 생체 전기신호 비활성, 및 신경세포 시냅스 관련 마커의 발현량 감소로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법:

줄기세포를 부유배양하여 스페로이드(spheroid)를 형성하는 스페로이드 형성 단계;

상기 스페로이드를 비타민 A를 포함하지 않는 배지에서 배양하여 대뇌 오가노이드(Organoid)로 분화시키는 분화 단계;

상기 대뇌 오가노이드에 신경상피 버드(Neuroepithelial bud)가 형성되면 독성물질 또는 치료 후보물질을 접촉

시키는 접촉 단계;

상기 대뇌 오가노이드를 비타민 A를 포함하는 배지에서 배양하여 성장시키는 성장 단계; 및

독성물질을 접촉시킨 대뇌 오가노이드 중에서 치료 후보물질의 접촉 여부 또는 처리량에 따른 구조적 또는 기능적 손상의 개선 정도의 차이를 비교하는 분석 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 줄기세포는 인간 유도만능 줄기세포(Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs), 인간 배아 줄기 세포(human embryonic stem cells, hESCs) 및 인간 전분화능 줄기세포(human Pluripotent Stem Cell; hPSC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 분화 단계는 다음 단계를 포함하는 것인, 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법:

상기 스페로이드에 배엽층(germ layer)을 형성하는 배엽층 형성 단계; 및

상기 배엽층이 형성된 스페로이드를 마트리겔(MatriGel)로 포매하는 포매 단계.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 독성물질은 디젤 배기 입자(Diesel-exhaust Particulate Matters; DPM), 미세먼지(Particulate Matter; PM) 및 총먼지(Total suspended Particles; TSP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 성장 단계는 15 내지 60일 동안 수행되는 것인, 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 구조적 손상 또는 기능적 손상은 대뇌 오가노이드의 조직 크기 20 내지 70% 감소, 뇌신경 조직 발현 마커(MAP2)의 발현량 감소, 염증 반응 관련 인자의 발현량 증가, 가바(GABA)-글루타메이트(Glutamate)의 발현 불균형, 생체 전기신호 비활성, 및 신경세포 시냅스 관련 마커의 발현량 감소로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대뇌 오가노이드(Organoid)를 이용하는 뇌신경 독성물질 또는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 대뇌 오가노이드 조직의 성장 및 분화를 유도하는 과정에서 독성물질을 처리하였을 경우 성장에 영향을 미치므로 스크리닝에 활용하기 위한 모델로 사용할 수 있고, 또한 뇌 신경계 발달 질환에 발달한 평가지표로서도 사용할 수 있는 대뇌 오가노이드를 제공하기 위한 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] '유사장기체'라고도 불리는 오가노이드(Organoid)는 줄기세포나 장기에서 분리한 세포를 3차원 배양을 통해 재응집·재조합하여 실제 장기와 유사한 조직화와 생체 장기의 기능 재현이 가능하므로 발달 및 질병 등 다양한 연구에 모델로 활용 가능하다.

[0003] 2013년 영국 연구진에 의해 대뇌와 기능 및 조직이 유사한 대뇌 오가노이드(Brain Organoid)가 제작되었다. 이러한 대뇌 오가노이드는 제작 과정에서 특정 영역으로의 분화 과정 없이 일반적인 뇌와 유사한 특성을 지닌 조직 유사체로 조직화되었으며, 이후 많은 연구진들이 다양한 영역의 뇌 오가노이드를 제작하고 발표하였다.

[0004] 한편, 미세먼지(Particulate Matter; PM)는 공기 중에 떠 다니는 작은 크기의 고체 입자와 액체 방울의 혼합물을 이르는 용어로, 오늘날 미세먼지는 건강에 대한 위해성으로 많은 주목을 받고 있다.

[0005] 먼지는 입자 크기가 50 μm 이하인 총먼지(Total suspended Particles; TSP)와 미세먼지(PM)로 나뉜다. 미세먼지는 다시 지름 10 μm 이하인 PM 10과 지름 2.5 μm 이하인 PM 2.5, 지름 0.1 μm (100 nm) 이하인 PM 0.1로 구분한다.

[0006] 대기오염의 주요 원인 중 하나인 자동차 배기가스, 그 중 특히 디젤 배기 입자(Diesel-exhaust Particulate Matters; DPM)는 공기역학적 직경이 2.5 μm 보다 작고, 대부분 지름 100 nm 이하인 PM 0.1로 대기 중에 오래 머물러, 다양한 경로로 인체에 영향을 미친다. DPM의 대부분은 폐로 흡입될 수 있을 정도로 작으며, 흡입된 입자들은 대부분 그 후에 배출되지만, 일부는 폐 표면에 침전된다.

[0007] 나노 크기(Nano scale)의 DPM 역시 일부가 PM 0.1이기 때문에 이들과 같은 나노 입자에 노출되었을 때와 동일한 비암성 영향을 미친다. 이러한 영향에는 천식, 호흡기 증상 증가, 소아 폐 기능 저하를 포함하여 악화되는 만성 심장 및 폐 질환에 대한 조기 사망 등이 포함된다. 폐가 아직 발달 중인 어린이들과 만성적인 건강 문제를 자주 겪는 노인들은 이러한 DPM의 영향에 가장 취약한 계층이다.

[0008] 나노 입자가 뇌에 도달하는 경로는 혈액을 타고 체내를 이동하여 혈액뇌장벽 (Blood Brain Barrier; BBB)을 거치는 간접 경로와 비강을 거쳐 후각 신경 (Olfactory Nerve Pathway)을 통하여 직접 뇌에 도달하는 직접 경로가 있다. 후각 신경 경로는 나노 입자에 의한 직접적인 영향을 확인할 수 있는 경로이다.

[0009] 다채널전극배열 시스템(Multielectrode Array System; MEA)은 여러 개의 전극이 신경세포의 활동전위를 동시에 측정하는 장비로 뇌 오가노이드의 활동전위의 변화를 측정함으로써 전기생리학적 변이 분석, 신경세포의 이온채널의 변화, 신호전달 속도, 신경세포 간의 신호전달 검출 등의 분석에 활용 가능하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 직접 경로를 통해 뇌에 미치는 나노입자의 영향을 뇌 오가노이드(Organoid)에서 확인하고자, 대뇌 오가노이드를 제작하고 나노크기의 디젤 배기 입자를 농도별로 처리한 후, 전기생리학적인 방법과 조직면역학적인 염색 방법을 통해 나노입자에 의한 조직 및 세포의 손상을 확인할 수 있다.

[0011] 이에, 본 발명의 목적은 다음 단계를 포함하는 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:

[0012] 줄기세포를 부유배양하여 스페로이드(spheroid)를 형성하는 스페로이드 형성 단계;

[0013] 상기 스페로이드를 비타민 A를 포함하지 않는 배지에서 배양하여 대뇌 오가노이드로 분화시키는 분화 단계;

[0014] 상기 대뇌 오가노이드에 신경상피 버드(Neuroepithelial bud)가 형성되면 시험물질을 접촉시키는 접촉 단계;

[0015] 상기 대뇌 오가노이드를 비타민 A를 포함하는 배지에서 배양하여 성장시키는 성장 단계; 및

[0016] 상기 대뇌 오가노이드의 구조적 또는 기능적 손상의 발생 정도를 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군에 대비하여 비교하는 분석 단계.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 다음 단계를 포함하는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:

[0018] 줄기세포를 부유배양하여 스페로이드를 형성하는 스페로이드 형성 단계;

[0019] 상기 스페로이드를 비타민 A를 포함하지 않는 배지에서 배양하여 대뇌 오가노이드로 분화시키는 분화 단계;

[0020] 상기 대뇌 오가노이드에 신경상피 버드가 형성되면 독성물질 또는 치료 후보물질을 접촉시키는 접촉 단계;

[0021] 상기 대뇌 오가노이드를 비타민 A를 포함하는 배지에서 배양하여 성장시키는 성장 단계; 및

[0022] 독성물질을 접촉시킨 대뇌 오가노이드 중에서 치료 후보물질의 접촉 여부 또는 처리량에 따른 구조적 또는 기능적 손상의 개선 정도의 차이를 비교하는 분석 단계.

[0023] 본 발명의 또 다른 목적은 대뇌 오가노이드의 뇌신경 독성물질 또는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질의 스크리닝 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0024] 본 발명은 대뇌 오가노이드(Organoid)를 이용하는 뇌신경 독성물질 또는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 대뇌 오가노이드는 인간 유도만능 줄기세포(Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs)로부터 분화를 유도하여 3개월 이상 배양한 것으로서 다채널전극배열 시스템(Multielectrode Array System; MEA)를 통해 나노크기의 디젤 배기 입자(Diesel-exhaust Particulate Matters; DPM) 노출에 의한 전기신호 변화를 관찰할 수 있고, 형광염색을 통해 신경전달 물질 분비 및 세포조직의 변화를 확인할 수 있어 나노입자를 비롯한 미세 플라스틱, 미세 금속 등 대기 오염물질에 의한 뇌 신경조직의 손상과 시냅스 가소성 변화를 측정하는데 활용이 가능하다.

[0025] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0026] 본 발명의 일 양태는 다음 단계를 포함하는 뇌신경 독성물질 스크리닝 방법이다:

[0027] 줄기세포를 부유배양하여 스페로이드(spheroid)를 형성하는 스페로이드 형성 단계;

[0028] 상기 스페로이드를 비타민 A를 포함하지 않는 배지에서 배양하여 대뇌 오가노이드로 분화시키는 분화 단계;

[0029] 상기 대뇌 오가노이드에 신경상피 버드(Neuroepithelial bud)가 형성되면 시험물질을 접촉시키는 접촉 단계;

[0030] 상기 대뇌 오가노이드를 비타민 A를 포함하는 배지에서 배양하여 성장시키는 성장 단계; 및

[0031] 상기 대뇌 오가노이드의 구조적 또는 기능적 손상의 발생 정도를 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군에 대비하여 비교하는 분석 단계.

[0032] 본 발명에 있어서 상기 줄기세포는 인간 유도만능 줄기세포(Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs), 인간 배아 줄기 세포(human embryonic stem cells, hESCs) 및 인간 전분화능 줄기세포(human Pluripotent Stem Cell; hPSC) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, hiPSCs인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 있어서 상기 스페로이드 형성 단계는 스페로이드를 형성하기 위하여 단일세포로 분리하여 부유배양한 줄기세포를 10,000 내지 1,000,000 cells/well로 분주하여 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 10,000 내지 500,000 cells/well, 10,000 내지 200,000 cells/well, 10,000 내지 100,000 cells/well, 20,000 내지 1,000,000 cells/well, 20,000 내지 500,000 cells/well, 20,000 내지 200,000 cells/well, 20,000 내지 100,000 cells/well, 50,000 내지 1,000,000 cells/well, 50,000 내지 500,000 cells/well, 50,000 내지 200,000 cells/well, 50,000 내지 100,000 cells/well, 100,000 내지 1,000,000 cells/well, 또는 100,000 내지 500,000 cells/well로 분주하여 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 100,000 내지 200,000 cells/well로 분주하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서 상기 분화 단계는 다음 단계를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0035] 상기 스페로이드에 배엽층(germ layer)을 형성하는 배엽층 형성 단계; 및

[0036] 상기 배엽층이 형성된 스페로이드를 마트리겔(MatriGel)로 포매하는 포매 단계.

[0037] 상기 배엽층 형성 단계는 신경유도배지(neural induction medium; NIM)에서 수행되는 것일 수 있고, 상기 신경유도배지는 DMEM-F12를 포함하는 것일 수 있고, N2 supplement, GlutaMAX supplement, MEM-NEAA 및 헤파린(heparin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0038] 상기 배엽층 형성 단계는 2 내지 10일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 8일, 2 내지 6일, 2 내지 5일, 4 내지 10일, 4 내지 8일, 또는 4 내지 6일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 4 내지 5일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 상기 포매 단계 이후의 구간에 해당하는 분화 단계는 대뇌 오가노이드 분화 배지(Cerebral organoid differentiation medium)에서 수행되는 것일 수 있고, 상기 대뇌 오가노이드 분화 배지는 DMEM-F12 및 통상적인 신경세포배양용 배지(Neurobasal medium)의 혼합물을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 DMEM-F12 및 통상적인 신경세포배양용 배지의 혼합 비율은 1:0.5 내지 1:2(v/v)인 것일 수 있고, 바람직하게는 1:0.5 내지 1:1.8(v/v), 1:0.5 내지 1:1.5(v/v), 1:0.5 내지 1:1.2(v/v), 1:0.5 내지 1:1(v/v), 1:0.8 내지 1:2(v/v), 1:0.8 내지 1:1.8(v/v), 1:0.8 내지 1:1.5(v/v), 1:0.8 내지 1:1.2(v/v), 1:0.8 내지 1:1(v/v), 1:1 내지 1:2(v/v), 1:1 내지 1:1.8(v/v), 또는 1:1 내지 1:1.5(v/v)인 것일 수 있고, 예를 들어, 1:1 내지 1:1.2(v/v)인 것일 수 있으

나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기 대뇌 오가노이드 분화 배지는 N2 supplement, 인슐린(insulin), GlutaMAX supplement, MEM-NEAA, 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin), 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 및 비타민 A(vitamin A)를 포함하지 않는 B27 supplement로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0041] 상기 포매 단계 이후의 구간에 해당하는 분화 단계는 2 내지 10일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 8일, 2 내지 6일, 2 내지 5일, 4 내지 10일, 4 내지 8일, 또는 4 내지 6일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 4 내지 5일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에 있어서 상기 성장 단계는 비타민 A를 포함하는 B27 supplement로 배지를 교체하여 수행되는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서 상기 시험물질은 디젤 배기 입자, 미세먼지(Particulate Matter; PM) 및 총먼지(Total suspended Particles; TSP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 디젤 배기 입자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에 있어서 상기 성장 단계는 15일 내지 90일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 15일 내지 80일, 15일 내지 70일, 15일 내지 60일, 15일 내지 50일, 15일 내지 40일, 15일 내지 30일, 25일 내지 90일, 25일 내지 80일, 25일 내지 70일, 25일 내지 60일, 25일 내지 50일, 또는 25일 내지 40일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 25일 내지 30일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에 있어서 상기 구조적 손상 또는 기능적 손상은 대뇌 오가노이드의 조직 크기 20 내지 70% 감소, 뇌신경 조직 발현 마커(MAP2)의 발현량 감소, 염증 반응 관련 인자의 발현량 증가, 가바(GABA)-글루타메이트(Glutamate)의 발현 불균형, 생체 전기신호 비활성, 및 신경세포 시냅스 관련 마커의 발현량 감소로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 다른 양태는 다음 단계를 포함하는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법이다:

[0047] 줄기세포를 부유배양하여 스페로이드를 형성하는 스페로이드 형성 단계;

[0048] 상기 스페로이드를 비타민 A를 포함하지 않는 배지에서 배양하여 대뇌 오가노이드로 분화시키는 분화 단계;

[0049] 상기 대뇌 오가노이드에 신경상피 버드가 형성되면 독성물질 또는 치료 후보물질을 접촉시키는 접촉 단계;

[0050] 상기 대뇌 오가노이드를 비타민 A를 포함하는 배지에서 배양하여 성장시키는 성장 단계; 및

[0051] 독성물질을 접촉시킨 대뇌 오가노이드 중에서 치료 후보물질의 접촉 여부 또는 처리량에 따른 구조적 또는 기능적 손상의 개선 정도의 차이를 비교하는 분석 단계.

[0052] 본 발명에 있어서 상기 줄기세포는 인간 유도만능 줄기세포(Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs), 인간 배아 줄기 세포(human embryonic stem cells, hESCs) 및 인간 전분화능 줄기세포(human Pluripotent Stem Cell; hPSC) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, hiPSCs인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에 있어서 상기 스페로이드 형성 단계는 스페로이드를 형성하기 위하여 단일세포로 분리하여 부유배양한 줄기세포를 10,000 내지 1,000,000 cells/well로 분주하여 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 10,000 내지 500,000 cells/well, 10,000 내지 200,000 cells/well, 10,000 내지 100,000 cells/well, 20,000 내지 1,000,000 cells/well, 20,000 내지 500,000 cells/well, 20,000 내지 200,000 cells/well, 20,000 내지 100,000 cells/well, 50,000 내지 1,000,000 cells/well, 50,000 내지 500,000 cells/well, 50,000 내지 200,000 cells/well, 50,000 내지 100,000 cells/well, 100,000 내지 1,000,000 cells/well, 또는 100,000 내지 500,000 cells/well로 분주하여 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 100,000 내지 200,000 cells/well로 분주하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명에 있어서 상기 분화 단계는 다음 단계를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0055] 상기 스페로이드에 배엽층을 형성하는 배엽층 형성 단계; 및

[0056] 상기 배엽층이 형성된 스페로이드를 마트리겔로 포매하는 포매 단계.

[0057] 상기 배엽층 형성 단계는 신경유도배지(neural induction medium; NIM)에서 수행되는 것일 수 있고, 상기 신경

유도배지는 DMEM-F12를 포함하는 것일 수 있고, N2 supplement, GlutaMAX supplement, MEM-NEAA 및 헤파린(heparin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0058] 상기 배엽층 형성 단계는 2 내지 10일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 8일, 2 내지 6일, 2 내지 5일, 4 내지 10일, 4 내지 8일, 또는 4 내지 6일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 4 내지 5일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 상기 포매 단계 이후의 구간에 해당하는 분화 단계는 대뇌 오가노이드 분화 배지에서 수행되는 것일 수 있고, 상기 대뇌 오가노이드 분화 배지는 DMEM-F12 및 통상적인 신경세포배양용 배지의 혼합물을 포함하는 것일 수 있으며, 상기 DMEM-F12 및 통상적인 신경세포배양용 배지의 혼합 비율은 1:0.5 내지 1:2(v/v)인 것일 수 있고, 바람직하게는 1:0.5 내지 1:1.8(v/v), 1:0.5 내지 1:1.5(v/v), 1:0.5 내지 1:1.2(v/v), 1:0.5 내지 1:1(v/v), 1:0.8 내지 1:2(v/v), 1:0.8 내지 1:1.8(v/v), 1:0.8 내지 1:1.5(v/v), 1:0.8 내지 1:1.2(v/v), 1:0.8 내지 1:1(v/v), 1:1 내지 1:2(v/v), 1:1 내지 1:1.8(v/v), 또는 1:1 내지 1:1.5(v/v)인 것일 수 있고, 예를 들어, 1:1 내지 1:1.2(v/v)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 상기 대뇌 오가노이드 분화 배지는 N2 supplement, 인슐린, GlutaMAX supplement, MEM-NEAA, 페니실린-스트렙토마이신, 2-머캅토에탄올, 및 비타민 A를 포함하지 않는 B27 supplement로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0061] 상기 포매 단계 이후의 구간에 해당하는 분화 단계는 2 내지 10일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 8일, 2 내지 6일, 2 내지 5일, 4 내지 10일, 4 내지 8일, 또는 4 내지 6일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 4 내지 5일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명에 있어서 상기 성장 단계는 비타민 A를 포함하는 B27 supplement로 배지를 교체하여 수행되는 것일 수 있다.

[0063] 본 발명에 있어서 상기 시험물질은 디젤 배기 입자, 미세먼지 및 총먼지로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 디젤 배기 입자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명에 있어서 상기 성장 단계는 15일 내지 90일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 15일 내지 80일, 15일 내지 70일, 15일 내지 60일, 15일 내지 50일, 15일 내지 40일, 15일 내지 30일, 25일 내지 90일, 25일 내지 80일, 25일 내지 70일, 25일 내지 60일, 25일 내지 50일, 또는 25일 내지 40일 동안 수행되는 것일 수 있고, 예를 들어, 25일 내지 30일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명에 있어서 상기 구조적 손상 또는 기능적 손상은 대뇌 오가노이드의 조직 크기 20 내지 70% 감소, 뇌신경 조직 발현 마커(MAP2)의 발현량 감소, 염증 반응 관련 인자의 발현량 증가, 가바(GABA)-글루타메이트(Glutamate)의 발현 불균형, 생체 전기신호 비활성, 및 신경세포 시냅스 관련 마커의 발현량 감소로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0066] 본 발명은 대뇌 오가노이드를 이용하는 뇌신경 독성물질 또는 뇌신경 발달 질환 치료 후보물질 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상기 스크리닝 시스템을 활용하면 대기 오염물질을 비롯하여 일상생활에서 접하는 식품, 특히 나노칼슘과 같이 흡수 및 기능 향상을 위한 식품제형을 비롯하여 보관과 유통을 용이하게 하기 위한 식품첨가제, 보존제, 포장재 등에 포함되어 있는 나노물질이 뇌 신경조직과 시냅스 가소성에 미치는 영향을 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 인간 유도만능 줄기세포(Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs)에서부터 대뇌 오가노이드(Organoid)로의 분화 과정을 나타낸 모식도이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따라 인간 유도만능 줄기세포에서부터 대뇌 오가노이드로의 분화에 의한 조직 변화를 나타낸 사진이다.

도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따라 투명화시켜 대뇌 오가노이드의 조직으로부터 분화 마커인 TTR, TUJ1, FOXG1 및 PROX1에 대한 형광면역염색을 수행한 결과 사진이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 조직의 성장 및 분화를 유도하는 과정에 나노입자를 처리하여 인간 유도만

능 줄기세포에서부터 대뇌 오가노이드로 분화시키는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 과정 중 농도별 나노입자가 처리된 대뇌 오가노이드를 나타낸 광학 현미경 및 형광 현미경 사진이다.

도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 과정 중 농도별 나노입자가 처리된 대뇌 오가노이드의 면적을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 과정 중의 나노입자 처리에 의한 대뇌 오가노이드의 염증 관련 마커 c-fos 및 p-ERK 발현량에 대한 형광면역염색 결과 사진이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 과정 중의 나노입자 처리에 의한 대뇌 오가노이드의 흥분성-억제성 신경전달물질 가바(GABA)-글루타메이트(Glutamate) 발현량에 대한 형광면역염색 결과 사진이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 과정 중의 나노입자 처리에 의한 대뇌 오가노이드의 전기생리학적 신호를 나타내는 사진이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따라 분화 과정 중의 나노입자 처리에 의한 대뇌 오가노이드의 시냅토파이신(Synaptophysin) 및 PSD95의 발현량에 대한 형광면역염색 결과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0069] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0071] **실시예 1: 대뇌 오가노이드의 제작**

[0072] **1-1. 스페로이드 제작 및 분화 유도**

[0073] 인간 유도만능 줄기세포(Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs)는 분화가 끝난 성체의 체세포에 역분화를 일으키는 4가지 특정 유전자(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)를 도입하여 배아줄기세포와 같은 만능분화능(Pluripotancy)을 갖도록 한 줄기세포이다. 유도만능 줄기세포는 윤리적인 문제와 면역거부반응 등의 문제에서 자유로우며, 다양한 조직으로의 분화가 가능하여 발생학을 비롯한 다양한 질병 및 치료제 연구에 활용되는 세포이다.

[0074] 도 1a 및 1b에서와 같이, 인간 유도만능 줄기세포는 라미닌(Laminin) 계열의 iMatrix-511로 코팅된 배양 용기에 StemFit Basic002 배지를 이용하여 배양하였다. 세포가 배양 용기의 70~80%로 자라면 TrypLE Select를 처리하여 단일 세포로 분리하였다. 분리한 세포는 원심분리 후 재부유시키고, 웰 플레이트(Ultra-low attachment 96 well plate)에 100,000 cells/well로 분주하여 스페로이드를 형성하였다.

[0075] 제작한 스페로이드는 지름이 500~600 μm 정도일 때, DMEM-F12에 1X N2 supplement, 1X GlutaMAX supplement, 1X MEM-NEAA와 1 μg/ml 헤파린(heparin)이 포함된 신경유도배지(neural induction medium; NIM)에서 4~5일 간 배양하였다.

[0076] 배엽층(Germ layer)이 형성된 스페로이드를 마트리겔(MatriGel)로 포매하여 DMEM-F12와 신경세포배양용 배지(Neurobasal medium)를 1:1(v/v)로 혼합한 배지에 0.5X N2 supplement, 62.5 μl 인슐린(insulin), 1X GlutaMAX supplement, 0.5X MEM-NEAA, 1X 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin), 10 μM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol)과, 비타민 A(vitamin A)를 포함하지 않는 1X B27 supplement가 포함된 대뇌 오가노이드 분화 배지(Cerebral organoid differentiation medium)에서 약 5일간 배양하였다.

[0077] 신경상피 버드(Neuroepithelial bud)가 형성되면 대뇌 오가노이드 분화 배지에서 비타민 A를 포함하는 1X B27 supplement로 교체하여 약 15일간 분화를 유도하여 대뇌 오가노이드를 제작하였다.

[0079] **1-2. 대뇌 오가노이드 관련 마커 확인**

[0080] 제작한 대뇌 오가노이드의 특이적 마커 발현을 확인하기 위해 조직 투명화 및 형광면역염색을 진행하였다. 3개월 이상의 분화 및 배양과정을 거친 대뇌 오가노이드를 4% 파라포름알데하이드로 고정한 후, 키트(Tissue Clearing Kit, BINAREE)를 이용하여 수행된 조직 투명화 과정을 통해 조직 내부의 단백질 발현을 관찰하였다.

[0081] 대뇌 오가노이드의 마커인 FOXG1과 TTR, 신경세포 마커인 TUJ1, 줄기세포 마커인 SOX2 등을 이용하여 형광면역염색을 수행하였고, 공초점 현미경(Confocal microscope)으로 형광을 확인하였다.

[0082] 도 1c에서 확인할 수 있듯이, 제작된 대뇌 오가노이드에서는 줄기세포에서 나타나는 특성 대신에 신경세포에서 발현되는 마커들이 관찰되었다.

[0084] **실시예 2: 나노 크기의 디젤 배기 입자 처리에 따른 대뇌 오가노이드 내 세포 및 조직 변화**

[0085] **2-1. 나노 크기의 디젤 배기 입자 처리 방법**

[0086] 디젤 배기 입자에 해당하는 나노입자 용액에 노출된 대뇌 오가노이드에 대하여 조직 투명화 및 형광면역염색 과정을 거쳐 세포 및 조직의 변화를 관찰하였다.

[0087] 도 2a에서와 같은 대뇌 오가노이드 준비 과정의 수행을 위하여, 구입한 나노 크기의 디젤 배기 입자(Nano scale Diesel particulate matter, SRM 2975, NIST)를 1 mg/ml의 농도로 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)에 희석하여 4℃에서 30분간 초음파 처리하여 나노입자 용액 스톡(stock)을 준비하였다.

[0088] 상기 나노입자 용액은 각각 1, 5, 10 μg/ml의 농도로 배엽층의 형성 후 조직의 분화 및 성장이 유도되는 성장단계의 대뇌 오가노이드에 처리하였다. 8시간 후, 나노입자를 포함한 배지를 제거하고, DPBS로 세척 후, 배양배지로 교체하였다. 이 과정을 3일 간격으로 30일간 반복한 후 광학 현미경과 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0089] 도 2b 및 2c에서 확인할 수 있듯이, 나노입자 용액의 농도가 증가할수록 조직의 크기가 정상 대뇌 조직(Control)에 비해 작아지고, 이에 따라 성장이 둔화되는 것으로 예상할 수 있었다. 나노입자 용액의 농도가 10 ug/ml인 경우, 일부 조직이 손상되어 조직의 크기가 급격하게 감소하였다. 또한 성숙한 뇌신경 조직에서 발현되는 마커인 MAP2의 면역염색 결과로부터 확인되는 발현양이 역시 나노입자 용액의 농도가 증가함에 따라 감소됨을 확인할 수 있어, 나노입자에 의하여 신경세포의 성숙이 저해됨을 확인할 수 있다.

[0090] 이후 비교 실험은 정상 대뇌 오가노이드와 대뇌 오가노이드 외부 조직의 손상을 배제할 수 있는 5 μg/ml의 농도로 나노입자를 처리하여 실험을 진행하였다.

[0092] **2-2. 나노입자 처리에 따른 염증반응 확인**

[0093] 나노입자 처리에 따른 염증 반응 증가 여부를 확인하기 위해 대표적인 신경계 면역 반응 물질인 c-fos 및 p-ERK를 형광면역염색을 통해 확인하였다. 상기 실시예 2-1과 같이 정상 대뇌 오가노이드와 5 ug/ml 농도의 나노입자에 노출된 대뇌 오가노이드를 각각 조직 투명화 및 형광면역염색 후 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.

[0094] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 나노입자 용액에 노출시킨 대뇌 오가노이드에서 c-fos와 p-ERK의 발현이 증가함으로써 나노입자가 뇌 신경조직에서 염증반응을 유발하는 것으로 관찰되었다.

[0096] **2-3. 나노입자 처리에 따른 신경전달물질 분비 불균형 확인**

[0097] 나노입자 처리에 따른 신경전달물질 분비 불균형 여부를 확인하기 위해 대표적인 흥분성-억제성 신경전달물질인 가바(GABA)-글루타메이트(Glutamate)의 발현 양상 변화를 확인하였다. 상기 실시예 2-1과 같이 정상 대뇌 오가노이드와 5 ug/ml 농도의 나노입자에 노출된 대뇌 오가노이드를 각각 조직 투명화 및 형광면역염색 후 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.

[0098] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 나노입자에 노출된 대뇌 오가노이드의 경우 가바(GAD67)의 발현에는 큰 변화를 보이지 않았으나, 글루타메이트(vGlut1)의 발현이 증가하는 양상을 나타내, 두 신경전달물질 간의 불균형 현상을 나타냈다.

[0100] **2-4. 나노입자 처리에 따른 생체 전기신호 변화 측정**

[0101] 5 μg/ml의 농도의 나노입자에 반복적으로 노출된 대뇌 오가노이드의 생체전기신호 변화를 관찰하였다.

[0102] 구체적으로, 분화 및 배양과정을 거친 대뇌 오가노이드에 대하여 다채널전극배열 시스템(Multielectrode Array System; MEA)을 통해 전기신호를 확인하였다. MEA 기판은 폴리에테르이미드(Polyetherimide; PEI)로 코팅한 후, 라미닌으로 재코팅하여 분화 및 성숙 과정을 거친 대뇌 오가노이드와 미세먼지에 노출된 대뇌 오가노이드를 올린 후 Maestro MEA system(Axion Biosystems)을 이용하여 생체 전기신호를 측정하였다. 이후 여러 전극에서 동시에 firing 신호를 관찰하여 신경망 형성 및 나노입자에 의한 신경망 손상 여부를 확인하였다.

[0103] 도 5a에서 확인할 수 있듯이, 나노입자를 처리하지 않은 정상 대뇌 오가노이드는 동시에 여러 전극에서 생체 신호를 감지할 수 있으므로, 신경망 연결이 정상적인 상태인 것으로 예상되었다. 반면 나노입자를 처리한 대뇌 오가노이드는 여러 전극에서 신호를 감지하지만 동시에 활성화되지 않는다는 점에서 신경망 형성이 비정상적인 상태임을 나타내는 결과로 해석할 수 있었다.

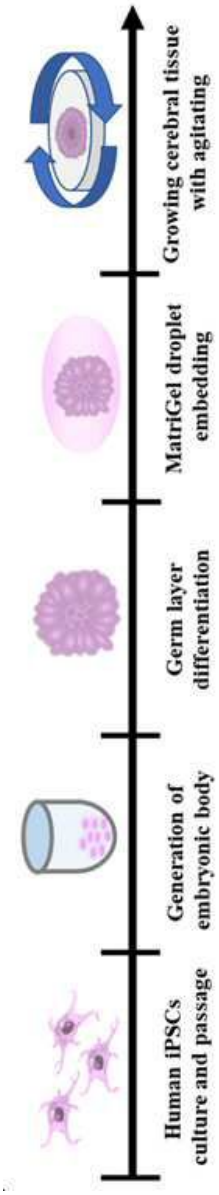
[0105] **2-5. 나노입자 처리에 따른 시냅스 형성 변화 관찰**

[0106] 대뇌 오가노이드 조직 내 신경망이 나노입자 처리에 따라 손상되는지의 여부를 시냅스 형성 변화 양상으로 유추하기 위하여, 형광면역염색을 통해 시냅토파이신(Synaptophysin) 및 PSD95의 발현을 확인하였다. 상기 실시예 1-2와 같이 정상 대뇌 오가노이드와 나노입자에 노출된 대뇌 오가노이드를 각각 조직 투명화 및 형광면역염색 후 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.

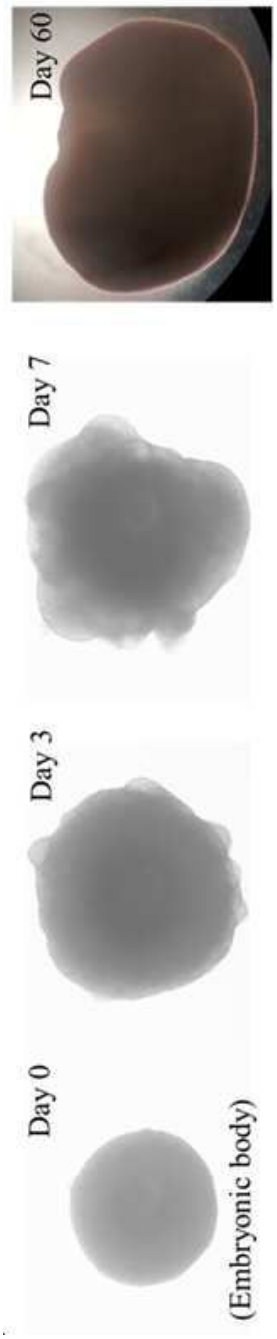
[0107] 도 5b에서 확인할 수 있듯이, 정상 대뇌 오가노이드는 시냅토파이신 및 PSD95의 발현이 고루 분포된 반면, 나노입자에 노출된 대뇌 오가노이드에서는 국소적으로 일부만 발현되는 것으로 나타났다. 이는 MEA를 통해 확인한 전기생리학적 신호와 마찬가지로 나노입자 노출에 의해 신경세포의 시냅스 형성이 손상될 수 있음을 보여주는 결과이다.

도면

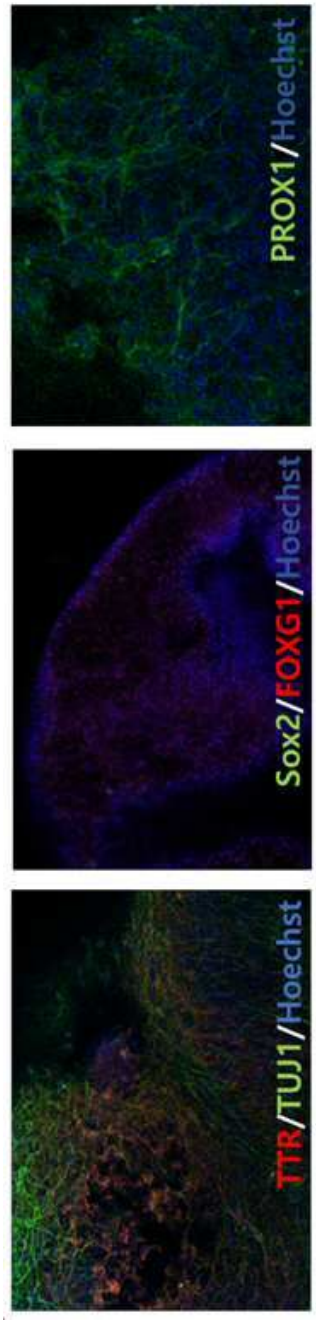
도면1a


Growing cerebral tissue with agitating
MatriGel droplet embedding
Germ layer differentiation
Generation of embryonic body
Human iPSCs culture and passage

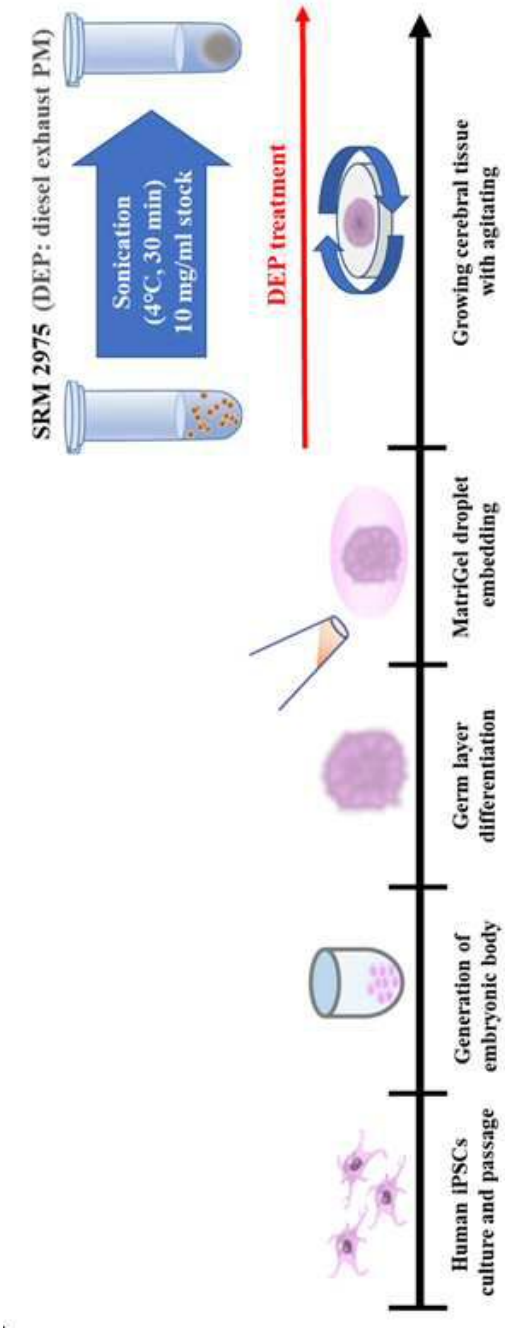
도면1b



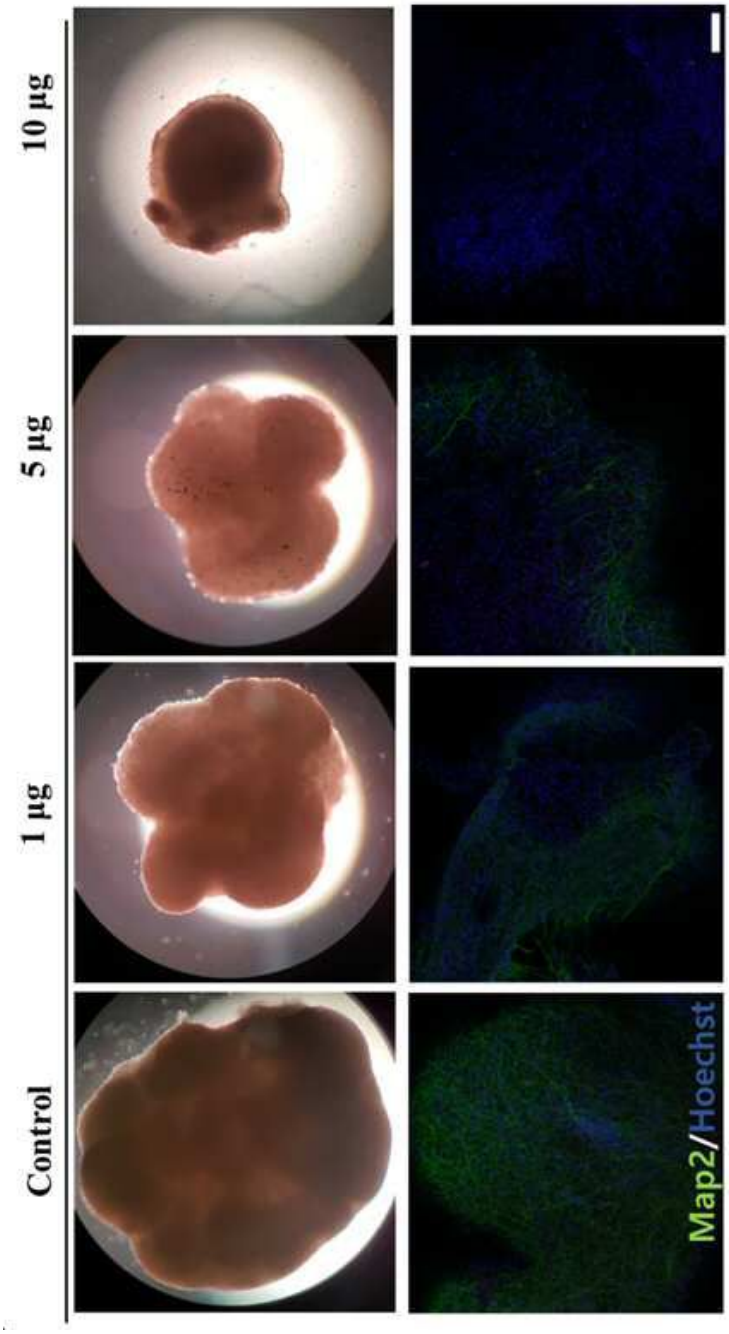
도면1c



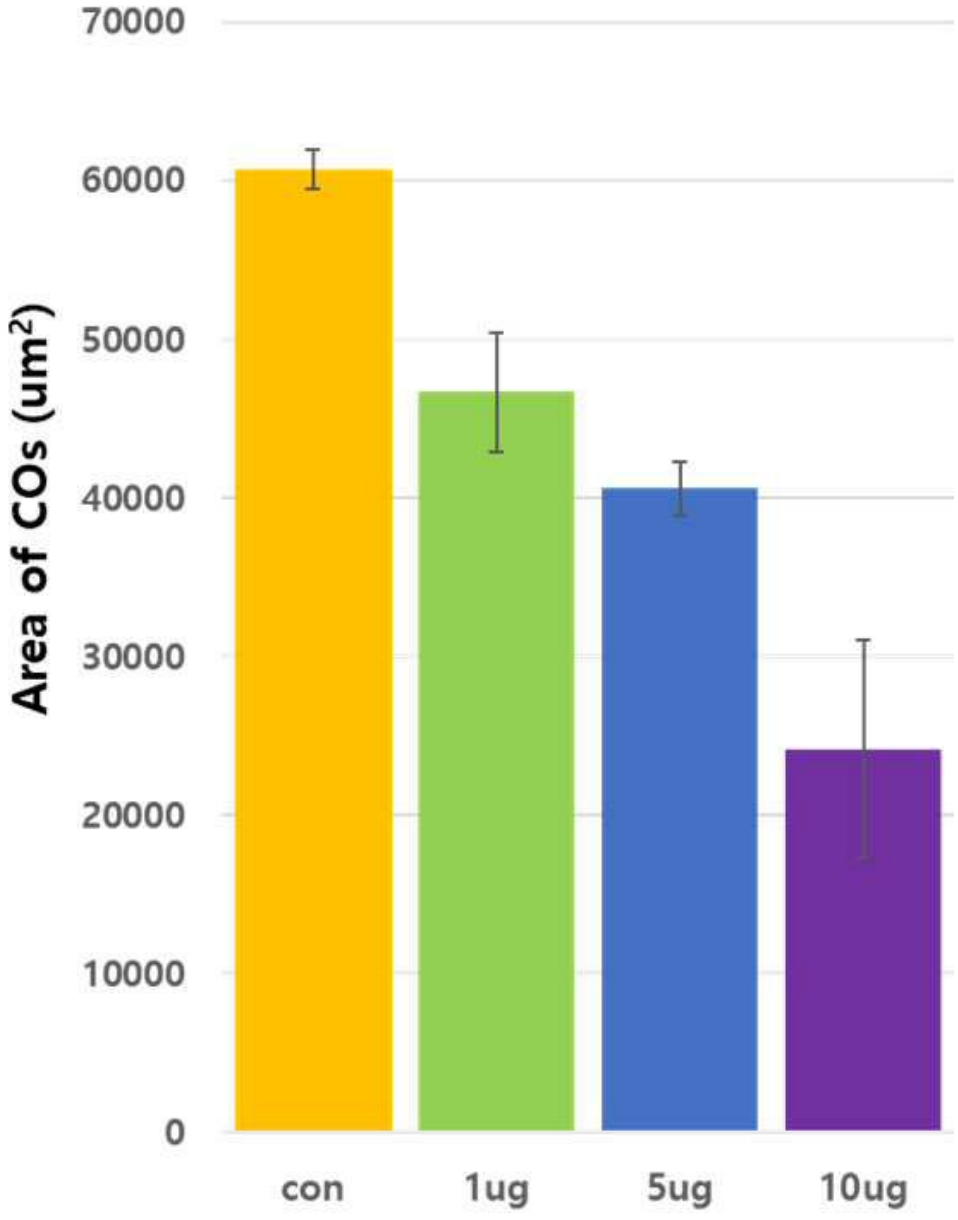
도면2a


SRM 2975 (DEP: diesel exhaust PM)
Sonication
(4℃, 30 min)
10 mg/ml stock
DEP treatment
Human iPSCs
culture and passage
Generation of
embryonic body
Germ layer
differentiation
MatriGel droplet
embedding
Growing cerebral tissue
with agitating

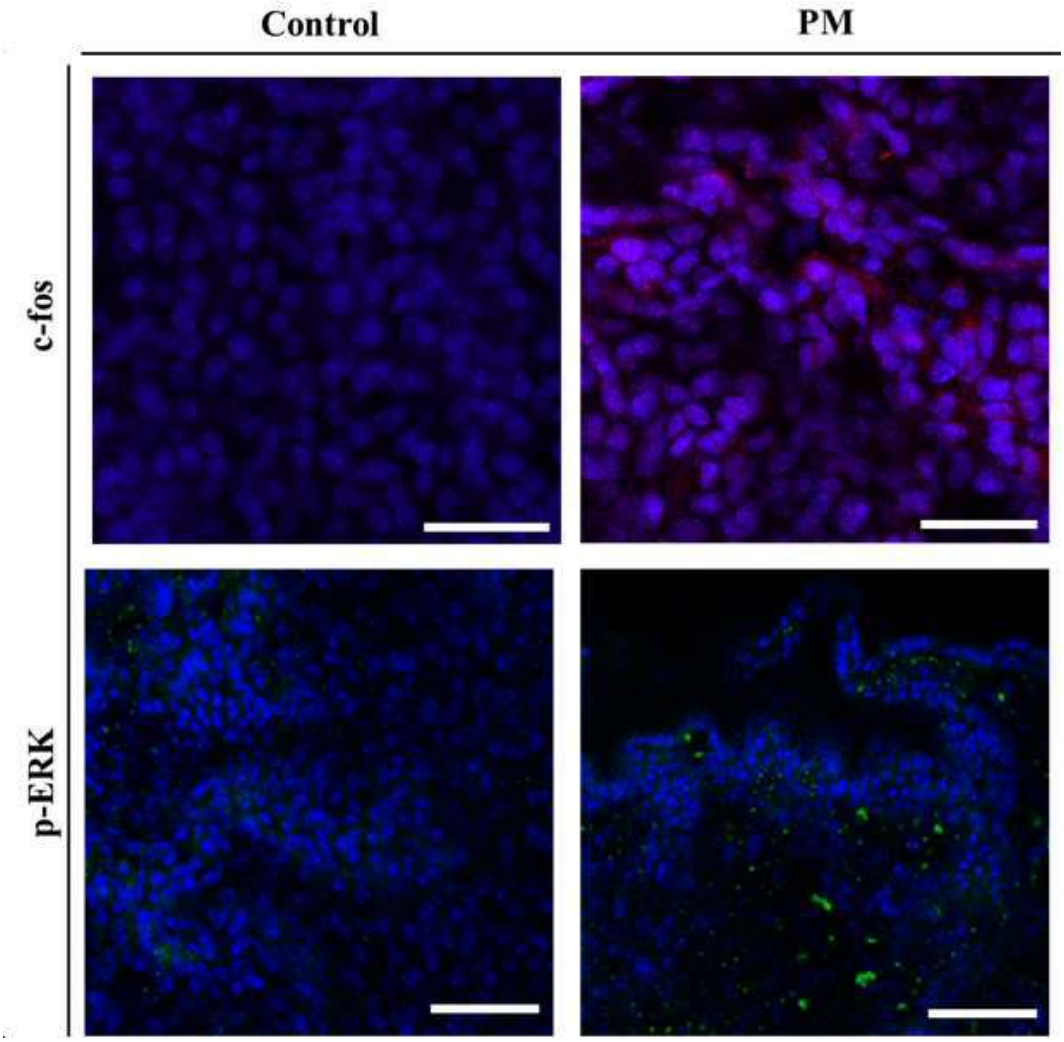
도면2b



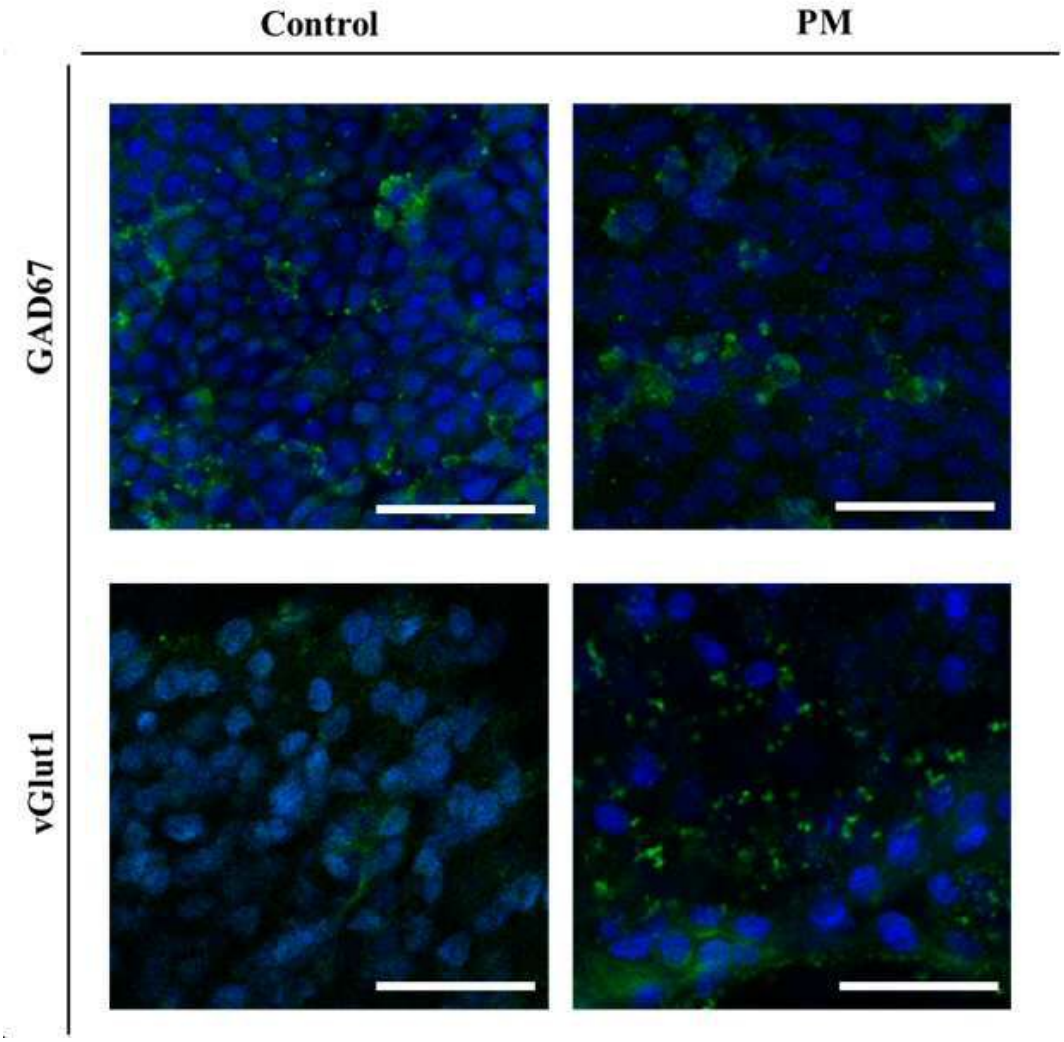
도면2c


70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Area of COs (um²)
con
1ug
5ug
10ug

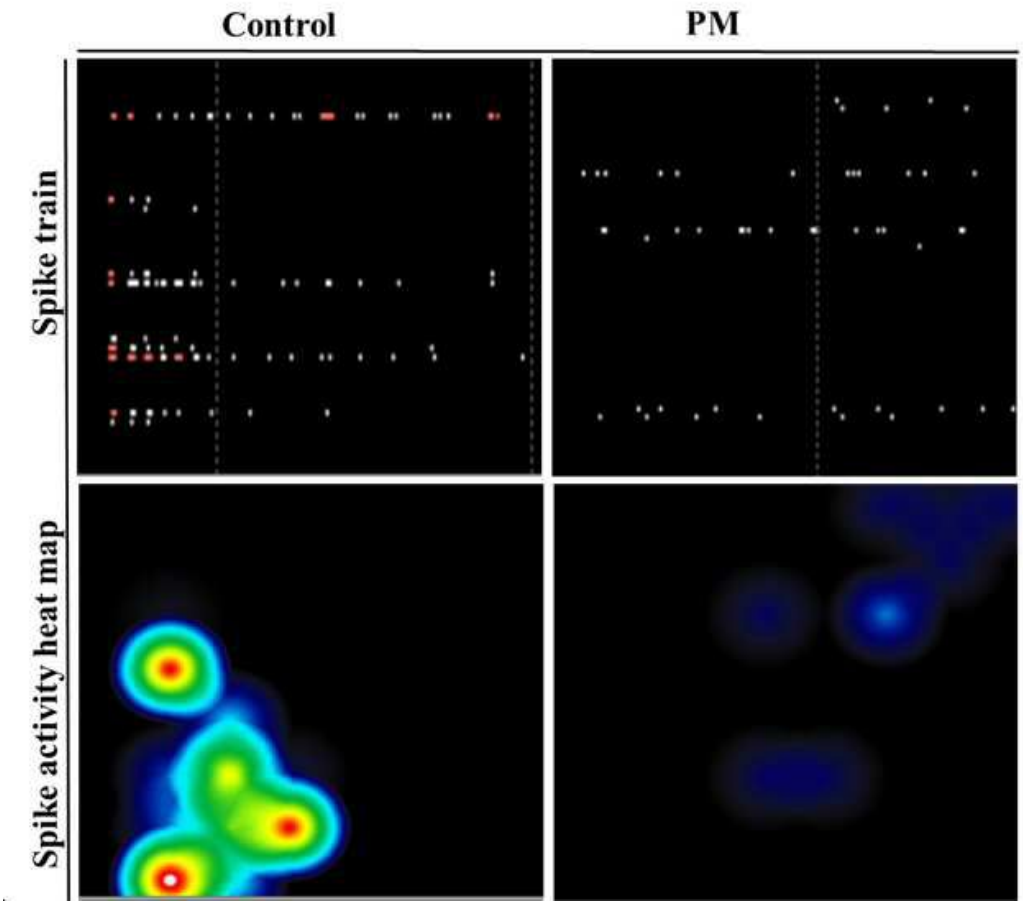
도면3



도면4



도면5a



도면5b

