



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0175165
(43) 공개일자 2024년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/062 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0074947
(22) 출원일자 2023년06월12일
심사청구일자 2023년06월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
정용택
서울특별시 서초구 고무래로 35 반포리체아파트
103동 1203호
오수민
서울특별시 은평구 갈현로 111 한양명진 1-301
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 17 항

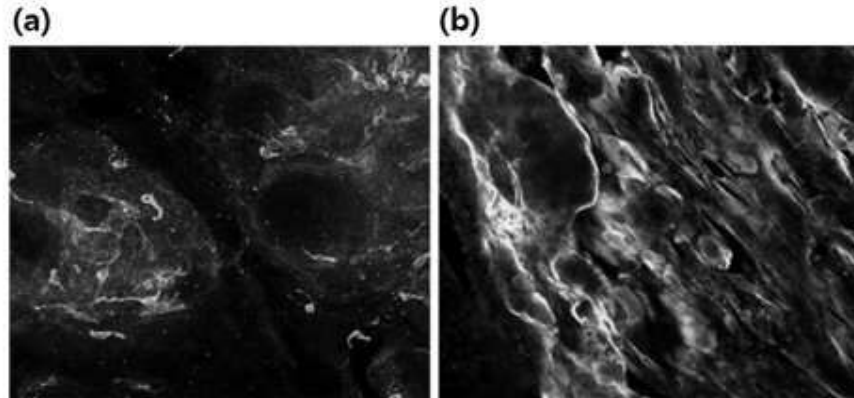
(54) 발명의 명칭 평면화 미뢰 오가노이드 제조방법

(57) 요약

본 발명은 허 전방부 상피세포를 이용한 평면화 미뢰 오가노이드 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드, 상기 오가노이드를 포함하는 세포 시트제 및 미각자극물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드는 3D 배양을 통해 형성된 오가노이드와 달리 미뢰 자극 부위가 노출되어 있어, 구강 조직의 상피층과 미각세포의 집합층을 재현하고 미각자극에 대한 세포반응을 확인하여 미각자극물질 스크리닝 및 미각세포 발현 연구에 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 2501/105 (2013.01)
 C12N 2501/11 (2013.01)
 C12N 2501/115 (2013.01)
 C12N 2501/155 (2013.01)
 C12N 2501/415 (2013.01)
 C12N 2501/727 (2013.01)
 C12N 2513/00 (2013.01)
 C12N 2523/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465034752
과제번호	21C0712L1-12
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명	범부처재생의료기술개발사업(R&D)
연구과제명	항암 화학 요법 및 방사선 요법에 의한 구강점막 괴사질환과 미각소실을 극복할 수 있는 오가노이드 기반 세포치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2021.08.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는, 평면화 미뢰 오가노이드 제조방법:

- (a) 세포외기질에 포매되어 있는 허 전방부 상피세포를 배양하여 미뢰 오가노이드를 함유한 배양물을 수득하는 단계;
- (b) 상기 배양물에서 세포외기질을 제거하는 단계;
- (c) 상기 세포외기질이 제거된 배양물에 효소를 첨가하고 물리적 압력을 가하여 단일세포를 수득하는 단계;
- (d) 상기 단일세포를 함유한 배양물을 원심분리하여 얻은 단일세포펠렛을 배지에 현탁하여 현탁액을 수득하는 단계;
- (e) 상기 현탁액을 배양 용기에 시딩(seeding)하는 단계; 및
- (f) 상기 배양 용기에 성장인자를 포함한 배지를 첨가한 후 배양하여 평면화 미뢰 오가노이드를 수득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 허 전방부 상피세포는 허 조직에 디스파제(dispace) 효소를 처리하여 상피층판을 분리하고, 이로부터 세포를 추출하여 얻어지는 것인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a)단계의 배양은 상기 허 전방부 상피세포를 R-스폰딘 1(R-spondin 1), 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist) 및 Y-27632를 포함하는 제1 배지 조성물 및, R-스폰딘 1(R-spondin 1), 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist), CHIR99021 및 SU5402를 포함하는 제2 배지 조성물에서 순차적으로 배양하는 것인, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (b)단계의 세포외기질이 매트릭젤(matrigel)인 경우 상기 배양물에 차가운(cold) DMEM/F12 배지를 처리하여 세포외기질을 제거하는, 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (b)단계의 세포외기질이 콜라겐(collagen)인 경우 상기 배양물에 콜라게나제(collagenase)를 처리하여 세포외기질을 제거하는, 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 콜라게나제를 처리한 후 10분 내지 30분간 37℃에서 인큐베이션하는 단계를 더 포함하는, 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (e) 단계의 현탁액 내 세포가 1×10^4 개 내지 1×10^8 개인, 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 성장인자는 EGF 및 Y27632 중 선택되는 하나 이상인, 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 효소는 트립플(Tryple), 트립신(Trypsin), EDTA 또는 아큐테이즈(Accutase)인, 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 (f)단계의 배양은 1일 내지 10일간 수행하는 것인, 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 (f)단계의 배양은 35℃ 내지 45℃에서 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (f)단계의 배양 이후 20℃ 내지 30℃에서 배양하는 단계를 더 포함하는, 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된, 평면화 미뢰 오가노이드.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 오가노이드는 제1 내지 제3 미각세포 및 각질세포가 오가노이드 표면으로 노출된 형태인, 평면화 미뢰 오

가노이드.

청구항 15

제13항의 평면화 미뢰 오가노이드를 포함하는 세포 시트제.

청구항 16

제13항의 평면화 미뢰 오가노이드에 대상물질을 처리하는 단계; 및

상기 대상물질이 미각자극물질인지 판별하는 단계;를 포함하는, 미각 자극물질의 스크리닝 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 판별은 평면화 미뢰 오가노이드를 처리한 대상물질의 맛 감지 단백질 발현량 변화를 측정하여 이루어지는 것인, 미각 자극물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 평면화 미뢰 오가노이드 제조방법, 상기 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드, 상기 오가노이드를 포함하는 세포 시트제 및 미각자극물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 미뢰는 맛자극에 대한 감각정보를 최초로 형성하는 일차 미각 기관으로 구강 내부의 혀 표면, 연구개, 인-후두부에 위치한다. 그 중 혀 후방부에 위치한 설유두인 성곽유두와 이와 유사한 엽상유두에 미뢰가 수십~수백개의 미뢰가 분포하고, 혀 전방부에 위치한 설유두인 용상유두의 경우 1~2개의 미뢰가 존재한다. 따라서 성곽유두 및 엽상유두는 미각 정보를 강하게 발생시킬 수 있는 반면, 용상유두에서는 맛자극에 대한 반응양상이 더 다채롭게 일어나므로 다양한 질의 미각정보를 형성한다. 미뢰는 수십 개의 세포로 이루어져 있으며, 유전자 발현, 맛자극 발현, 형태학적인 분류에 따라 제1형, 제2형, 제3형, 제4형 미각세포로 구분할 수 있다.

[0004] 종래 2D 배양 기법의 줄기세포 연구는 세포 본연의 성질과 조직 단위의 특성을 잃어버리기 쉽고, 동물모델은 인체의 장기와 생물학적 차이가 있어 조직 재생의 일반화에 부적합하다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 3D 배양 기법을 통한 오가노이드 제조가 대두되고 있다.

[0005] 다능성줄기세포 및 성체줄기세포를 세포외기질 유사 매트릭스에 포매하여 3차원으로 배양함으로써 생성할 수 있는 오가노이드는 줄기세포의 분화능을 인공적으로 조작함으로써 모사하고자하는 장기의 세포, 장기의 특이 구조 및 기능 등을 갖는 세포의 집합체이다. 오가노이드 배양법을 활용해 미뢰 주변에 존재하는 미뢰 줄기세포를 배양함으로써 미뢰 오가노이드를 형성하는 방법이 소개되었으며, 미뢰 내 구성세포인 제 1형, 제 2형, 제 3형, 제 4형 미각세포로 분화시킬 수 있다. 다만, 오가노이드를 통한 조직 재현에 있어 침샘, 눈물샘 등 내강이 존재하는 기관은 오가노이드화되었을 때 본래의 극성을 잘 형성할 수 있으나, 구강점막, 미뢰와 같은 이장 상피는 내강이 존재하지 않고 정단부(apical) 부위가 생체 외부로 노출되어 있는 구조이므로, 3D 배양을 통한 오가노이드 형성 시 본래 조직과 정반대의 극성을 가지게 된다.

[0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 미뢰 상피세포의 평면화를 통해 미뢰 자극부위가 노출된 형태의 오가노이드를 형성하기 위한 방법을 예의 연구 노력한 결과, 평면화된 미뢰 오가노이드 제조방법을 확립하고, 이러한 방법으로부터 형성한 혀 전방부 상피 유래 평면화 미뢰 오가노이드가 구강 조직의 상피면을 재현할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2021-0078704호

발명의 내용

해결하려는 과제

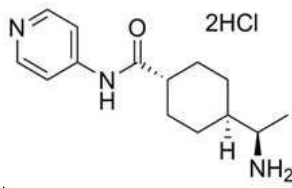
- [0009] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명의 일 예시적 목적은 다음의 단계를 포함하는, 평면화 미뢰 오가노이드 제조방법을 제공하는 것이다:
- [0011] (a) 허 전방부 상피세포를 배양하여 미뢰 오가노이드를 함유한 배양물을 수득하는 단계;
- [0012] (b) 상기 배양물에서 세포외기질을 제거하는 단계;
- [0013] (c) 상기 세포외기질이 제거된 배양물에 효소를 첨가하고 물리적 압력을 가하여 단일세포를 수득하는 단계;
- [0014] (d) 상기 단일세포를 함유한 배양물을 원심분리하여 얻은 단일세포펠렛을 배지에 현탁하여 현탁액을 수득하는 단계;
- [0015] (e) 상기 현탁액을 배양 용기에 시딩(seeding)하는 단계; 및
- [0016] (f) 상기 배양 용기에 성장인자를 포함한 배지를 첨가한 후 배양하여 평면화 미뢰 오가노이드를 수득하는 단계.
- [0017] 본 발명의 다른 예시적 목적은 상기 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드를 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 평면화 미뢰 오가노이드를 포함하는 세포 시트제를 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 평면화 미뢰 오가노이드에 대상물질을 처리하는 단계; 및 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판별하는 단계;를 포함하는, 미각 자극물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 명세서에 개시된 발명의 기술적 사상에 따라 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제는 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0024] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 평면화 미뢰 오가노이드 제조방법을 제공한다.
- [0025] (a) 허 전방부 상피세포를 배양하여 미뢰 오가노이드를 함유한 배양물을 수득하는 단계;
- [0026] (b) 상기 배양물에서 세포외기질을 제거하는 단계;
- [0027] (c) 상기 세포외기질이 제거된 배양물에 효소를 첨가하고 물리적 압력을 가하여 단일세포를 수득하는 단계;
- [0028] (d) 상기 단일세포를 함유한 배양물을 원심분리하여 얻은 단일세포펠렛을 배지에 현탁하여 현탁액을 수득하는 단계;
- [0029] (e) 상기 현탁액을 배양 용기에 시딩(seeding)하는 단계; 및

- [0030] (f) 상기 배양 용기에 성장인자를 포함한 배지를 첨가한 후 배양하여 평면화 미뢰 오가노이드를 수득하는 단계.
- [0031] 본 발명의 용어 "미뢰(taste bud)"는 혀 또는 연구개 등의 구강에 분포하는 세포로, 음식과 접촉하여 맛을 느끼는 역할을 수행할 수 있고, 구체적으로는 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛 및 감칠맛을 느낄 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [0032] 본 발명의 용어 "오가노이드(organoid)"는 1차 조직(primary tissue), 조직 하위단위 또는 단일세포(예를 들어 줄기세포)로 구성된 생체 외 3차원 세포 집합체(3D cellular cluster)를 의미한다. 오가노이드는 자가재생(self-renewal) 및 자가조직화(self-organization)가 가능한 특징을 가지며, 본래 조직과 유사한 표현형 및 기능을 구현할 수 있으므로, '소형 유사 장기' 또는 '장기 유사체'로도 명명될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 용어 "평면화 미뢰 오가노이드"는 3D 배양을 통해 형성된 오가노이드가 평면화된 형태로, 평면화를 통해 미뢰 자극부위가 노출된 형태를 확보할 수 있어 미각자극에 대한 세포 반응을 연구하기에 적합하고, 미각 자극물질을 스크리닝하는 플랫폼을 구축하여 미각세포 발현의 기초연구에 이바지할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 용어 "배양"은 생체로부터 분리된 세포, 이들의 2차원 또는 3차원적 집합체, 조직 또는 조직의 일부를 체외에서 증식, 성장, 유지 및 분화시키는 것을 의미한다. 이에, 용어 "배양"은 출발 물질(세포, 조직 또는 조직 유사체)을 이용하여 인공적인 환경 하에서 목적 물질을 수득하는 전 과정을 포괄하는 의미이며, 이에 "배양용 조성물"은 "증식용 조성물", "성장용 조성물", "유지용 조성물" 및 "분화 유도용 조성물"을 모두 포함하는 개념이다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 혀 전방부 상피세포는 혀 조직에 디스파제(dispace) 효소를 처리하여 상피층판을 분리하고, 이로부터 세포를 추출하여 얻어질 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계의 배양은 R-스폰딘 1(R-spondin 1), 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist) 및 Y-27632를 포함하는 제1 배지 조성물 및, R-스폰딘 1(R-spondin 1), 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist), CHIR99021 및 SU5402를 포함하는 제2 배지 조성물에서 순차적으로 배양하는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 세포외기질은 마트리젤(Matrigel) 또는 콜라겐(collagen)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 세포외기질이 마트리젤(matrigel)인 경우 상기 배양물에 차가운(cold) DMEM/F12 배지를 처리하여 세포외기질을 제거할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 세포외기질이 콜라겐(collagen)인 경우 상기 배양물에 콜라게나제(collagenase)를 처리하여 세포외기질을 제거할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예로, 상기 콜라게나제를 처리한 후 10분 내지 30분, 구체적으로 15분 내지 25분, 더욱 구체적으로 15분 내지 20분간 분간 37℃에서 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 (e) 단계의 현탁액 내 세포는 1×10^4 개 내지 1×10^8 개일 수 있고, 구체적으로 1×10^5 개 내지 1×10^7 개일 수 있으며, 더욱 구체적으로 1×10^5 개 내지 1×10^6 개 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 성장인자는 EGF 및 Y27632 중 선택되는 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 상기 EGF는 상피 성장인자로 세포 내 신호경로를 조절하여 증식, 분화 및 자가 복제에 영향을 미치며, 배지 조성물 내 EGF의 농도는 미뢰 구성 세포를 효율적으로 증식, 분화시키기 위해 적절히 선택될 수 있다.
- [0044] 상기 Y-27632(디하이드로클로라이드)는 Rho/Rock 신호 경로를 억제하는 화합물로서 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 배지 조성물 내 Y-27632의 농도는 미뢰 구성 세포를 효율적으로 증식, 분화시키기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0045] [화학식 1]



[0046]

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 세포외기질이 제거된 오가노이드를 미뢰세포 및 각질세포의 단일세포로 획득하기 위해 사용되는 것으로, 일 예로, 트리플(Tryple), 트립신(Trypsin), EDTA 또는 아큐테이즈(Accutase)일 수 있고, 구체적으로 트리플일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 (f)단계의 배양은 1일 내지 10일간 수행될 수 있고, 구체적으로 2일 내지 8일간 또는 3일 내지 7일간 수행될 수 있으며, 더욱 구체적으로 4일 내지 7일간 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 (f)단계의 배양은 35℃ 내지 45℃에서 수행될 수 있고, 구체적으로 35℃ 내지 38℃에서 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 (f)단계의 배양 이후 20℃ 내지 30℃에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 구체적으로 20℃ 내지 25℃에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 배양 용기의 표면은 N-isopropylacrylamide(PIPAAm)으로 코팅된 것일 수 있다. 37℃ 이상의 온도에서는 상기 코팅 층이 소수성이므로 세포의 부착 및 성장이 가능하나, 32℃ 이하의 온도에서는 코팅 층이 친수성으로 바뀌면서 물과 결합하여 부풀어올라 세포가 용기로부터 탈착될 수 있다.

[0052] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드를 제공한다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 평면화 미뢰 오가노이드는 제1 내지 제3 미각세포 및 각질세포가 오가노이드 표면으로 노출된 형태일 수 있다.

[0054] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는, 상기 제조방법으로 평면화 미뢰 오가노이드를 제조하였으며, 면역형광염색을 통해 제조된 오가노이드를 관찰하였을 때 제1,2,3형 미뢰세포 및 각질세포가 분포하는 것을 확인하였다.

[0055] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 평면화 미뢰 오가노이드를 포함하는 세포 시트제를 제공한다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 세포 시트제는 평면화 미뢰 오가노이드를 포함하는 시트 형태로 형성되는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 세포 시트제는 구강의 상피층 및 미각세포의 집합층이 재현되어 있어, 미각자극에 대한 세포반응을 확인할 수 있다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 세포 시트제는 구강 병변 부위에 부착시켜 구강병변을 예방 또는 치료하는 용도로 사용될 수 있다.

[0059] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 평면화 미뢰 오가노이드에 대상물질을 처리하는 단계; 및

[0060] 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판별하는 단계;를 포함하는, 미각 자극물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0061] 본 발명의 평면화 미뢰 오가노이드는 짠맛에 대해 반응하는 세포군이 포함된 혀 전방부 상피(융상유두 포함)로부터 형성된 것이고, 상기 세포군이 결핍된 혀 후방부(성곽유두 및 엽상유두 포함)로부터 형성된 것이 아니므로, 짠맛을 감지할 수 있는 단백질이 발현되어 있는 미뢰 세포를 포함하고 있다. 따라서, 본 발명의 평면화 미뢰 오가노이드를 세포 센서로 이용할 경우, 짠맛을 포함한 다양한 맛 자극물질에 대한 스크리닝이 가능하다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 평면화 미뢰 오가노이드를 처리한 대상물질의 맛 감지 단백질 발현량의 변화를 측정하여 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판별할 수 있다.

- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 맛 감지 단백질은 TRPM5 등이 있을 수 있으며 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명의 일 구현예에서, 대상물질에 대한 상기 미뢰 오가노이드의 반응을 전기생리기법(예를 들어 패치클램프), 칼슘 이미징 등을 활용한 세포활성도 변화에 의해 측정함으로써 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판단할 수 있다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드는 3D 배양을 통해 형성된 오가노이드와 달리 미뢰 자극 부위가 노출되어 있어, 구강 조직의 상피층과 미각세포의 집합층을 재현하고 미각자극에 대한 세포반응을 확인하여 미각자극물질 스크리닝 및 미각세포 발현 연구에 이용될 수 있다.
- [0067] 다만, 본 명세서에 개시된 기술의 일 실시예에 따른 효과는 이상에서 언급한 것들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0069] 본 명세서에서 인용되는 도면을 보다 충분히 이해하기 위하여 각 도면의 간단한 설명이 제공된다.
- 도 1은 전방부 혀 오가노이드 제작 과정을 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드(세포 시트제)를 확인한 결과이다(a : 업셀 디쉬에 시딩한 직후 세포 모습, b : 4 내지 7일간 배양 후 형성된 평면화 미뢰 오가노이드).
- 도 3은 본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드를 (a) 배양 용기에서 탈착하는 모습 및 (b) 적절한 크기로 잘라 배양액에 담그는 모습을 나타낸 것이다.
- 도 4는 면역형광염색을 통해 본 발명의 제조방법으로 제조된 평면화 미뢰 오가노이드에 분포하는 제1 내지 제3 미뢰세포 및 각질세포를 확인한 결과이다(a : 제1, 2, 3형 미뢰세포 확인, b : 각질세포 확인).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0070] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0072] 실시예 1: 전방부 혀 오가노이드 제조

- [0073] 마우스로부터 혀를 채취하여, 생리식염수에 희석한 dispase II 효소(2mg/mL)(Roche, cat #4942078001)를 상피와 상피 하 결합조직의 사이 공간에 주입하여 팽창시키고(도 1의 ②), 이렇게 팽창된 혀 조직을 dispase II 효소 희석액에서 37℃에서 30분 배양하였다. 상피 하 결합조직으로부터 상피층을 박리해 상피층판을 분리하고, 이를 trypsin/EDTA (Gibco, cat #25200072)용액 내부에서 멸균된 수술용 가위, 칼 등의 도구를 이용하여 최대한 작은 면적으로 잘게 잘랐다. 잘게 자른 조직을 37℃에서 30분 배양하였다. 이후, 연속적인 피페팅으로 잘게 자른 조직의 배양액을 필터링하고 압력을 가하여 조직으로부터 세포를 추출하여 단일세포 현탁액을 형성하였다. 이 현탁액을 원심분리를 하여 얻은 세포 펠렛을 적절한 비율로 매트릭젤(Matrigel) 또는 콜라겐(collagen) 등의 세포 외 기질에 포매하여 배양하였다. 배양액은 기본 배양액(DMEM/F12 + 1x GlutaMax + 1x HEPES + 1x N2 보충액 + 1x B27 보충액 + 1x penicillin/streptomycin)을 기초로 제1 배지 조성물(20% R-spondin 1, 10% Noggin, 50 ng/mL FGF2, 50 ng/mL IGF1 (BioLegend, cat #590908), 1 μ M SAG (Abcam, cat #ab142160), 10 μ M Y-27632 (Cayman chemical, cat # Cay10005583-50))을 첨가한 배지에서 4일간 배양한 후, 기본 배양액에 제2 배지 조성물(20% R-spondin 1, 10% Noggin, 50 ng/mL FGF2, 50 ng/mL IGF1, 1 μ M SAG, 3 μ M CHIR99021 (Sigma, cat #SML1046-5MG), 10 μ M SU5402 (Sigma, cat #SML0443-5MG))을 첨가한 배지로 교체하고, 2 내지 3 일마다 교체하면서 총 7 내지 10일간 배양하여 오가노이드 세포집합체를 함유한 배양물을 수득하였다.

[0075] 실시예 2: 평면화 미뢰 오가노이드 제조

[0076] 실시예 1에서 수득한 배양물에서 세포외기질을 제거하였다. 세포외기질을 마트리젤로 사용한 경우 배양 용기에 차가운(cold) DMEM/F12 배지(Gibco, #11320033)를 처리하였으며, 콜라겐을 사용한 경우 콜라게나제(collagenase)를 첨가하고 37℃에서 15 내지 20분 처리하여 세포외기질을 제거하였다. 이후 배양물에 Tryple(Gibco, cat #12604013)을 첨가하고 유리 파이펫을 이용해 연속적인 압력을 5분 이상 가하여 오가노이드를 깨서 단일세포형태로 만들었다. 이후 RCF 450g, 4℃ 조건에서 4분 30초간 원심분리를 통해 단일세포 펠렛을 수득한 후 37℃로 가열한 배지(실시예 1에서 제조한, 기본 배양액을 기초로 제1 배지 조성물을 첨가한 배지)에 펠렛을 풀고 1×10^6 개의 세포를 PIPAAm으로 표면이 코팅된 업셀 디쉬(upcell dish)에 시딩(seeding)하였다. 이후 50 ng/mL 농도의 EGF 및 10 μ M 농도의 Y27632를 포함한 배지를 첨가하여 37℃에서 4 내지 7일간 배양하여, 세포 confluency(부착세포로 덮인 배양 접시 표면 백분율)가 90% 이상인 평면화 미뢰 오가노이드(세포 시트제)를 제조하였다(도 2, a : 업셀 디쉬에 시딩한 직후 세포 모습, b : 4 내지 7일간 배양 후 형성된 평면화 미뢰 오가노이드).

[0077] 이후 배양물이 담긴 디쉬를 20℃ 내지 25℃의 환경으로 옮긴 후 실시예 1에서 제조한 기본 배양액으로 배양액을 교체하였다. 20 내지 30분간 방치하여 세포 시트제가 용기에서 탈착되었으며, 파이펫 또는 멤브레인을 사용하여 세포시트를 분리하였다(도 3, a : 세포 시트제가 용기에서 탈착되는 모습, b : 적절한 크기로 시트를 잘라 배양액에 담긴 모습).

[0079] 실시예 3: 평면화 미뢰 오가노이드의 형태 평가

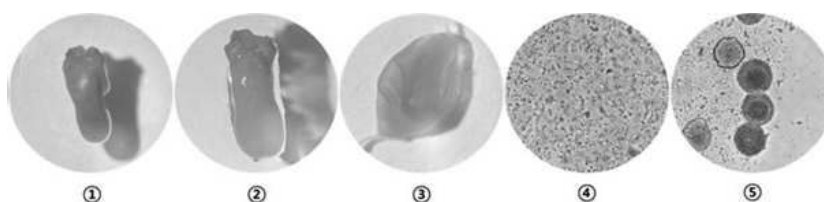
[0080] 실시예 2에서 제조한 평면화 미뢰 오가노이드를 면역형광분석을 통해 관찰하였다. 구체적으로, 실시예 2에서 탈착한 시트를 4% PFA 용액에 담근 후 10분간 실온에 두었다. 이후 0.2% PBST washing solution에 담근 후 5분 실온에 두는 방식으로 3번 세척하였다. PBST에 5% 당나귀 세럼(donkey serum)을 첨가하여 블로킹 용액(blocking solution)을 제조하여 시트를 담근 후 30분간 실온에 두었다. 이후 새로운 블로킹 용액에 미각세포를 검출하는 1차 항체를 첨가한 뒤 시트를 넣고 4℃에서 24시간 두었다. 0.2% PBST 세척 용액에 담근 후 10분간 실온에서 3번 세척한 뒤, 블로킹 용액에 이차 항체를 첨가하고 시트를 넣고 차광하여 실온에 2시간 두었다. 세척한 뒤 마이크로포셉을 이용해 시트를 슬라이드에 펼쳐놓고 마운팅 용액(mounting solution)을 떨어트린 후 커버 슬립으로 덮어주고, 공초점 현미경으로 면역형광 염색된 시트를 확인하였다.

[0081] 그 결과, 분화된 제 1, 2, 3형 미각세포군 및 각질세포군을 가진 단층 세포 시트임을 확인하였다(도 4, a : 제 1, 2, 3형 미뢰세포 확인, b : 각질세포 확인).

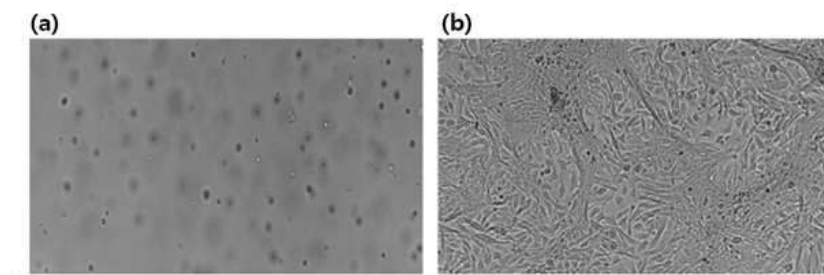
[0083] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

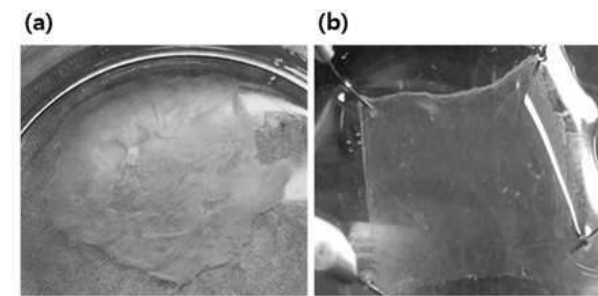
도면1



도면2



도면3



도면4

