

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0007766

(43) 공개일자 2023년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 3/00 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01) C12M 1/32 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12M 21/08 (2013.01)

C12M 23/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0088493

(22) 출원일자 2021년07월06일

심사청구일자 2021년07월06일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

가톨릭대학교 산학협력단

서울특별시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교
성의교정내 (반포동)

(72) 발명자

정봉근

서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 R관
618호

이한나

서울특별시 서초구 양재대로2길 34, 303동 2007호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅

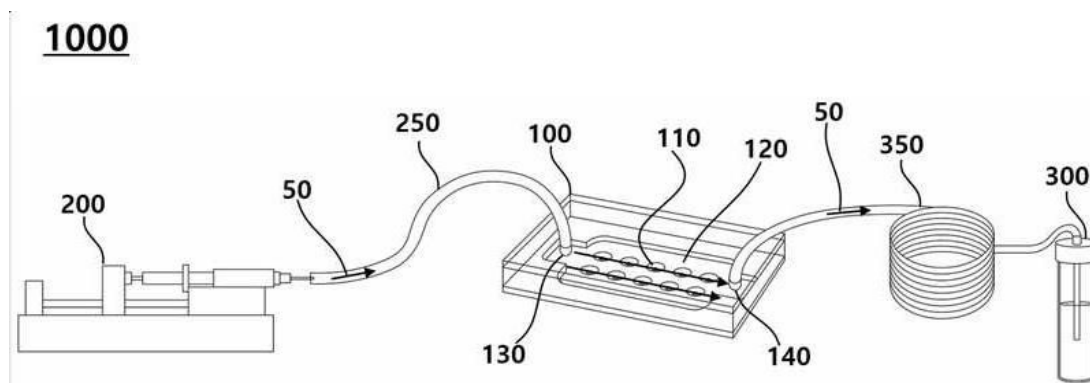
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 혈관화된 신장 오가노이드 형성을 위한 세포기질의 최적화 및 오가노이드 칩 개발

(57) 요약

본 발명은 혈관화된 신장 오가노이드 형성을 위한 세포기질의 최적화 및 오가노이드 칩에 관한 것으로, 구체적으로는, 오가노이드 중심부의 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포 괴사를 방지하기 위한 오가노이드 배양 시스템 및 이를 이용한 오가노이드 생산방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12M 23/12 (2013.01)
C12M 23/20 (2013.01)
C12M 29/18 (2013.01)
C12N 5/0686 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)
C12N 2533/90 (2013.01)

(72) 발명자

최윤영

서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 RA관 405호

이영서

서울특별시 종로구 통일로 246-20, 110동 1803호

최지욱

서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 RA관 405호

김용균

경기도 성남시 분당구 수내로 148, 108동 503호

남선아

경기도 김포시 고촌읍 신곡로 33, 102동 1403호

김진원

서울특별시 송파구 백제고분로31길 24, 304호

이중영

서울특별시 동작구 국사봉2길 17-10

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129031
과제번호	2019M3A9H2031820
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	만능줄기세포 기반 콩팥오가노이드 정밀 분화 분석 및 고효율 약물 독성/효능 평가
용 오가노이드칩 기술 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128452
과제번호	2019M3A9H2032546
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명	콩팥 오가노이드 기반 콩팥 질환 모델링 및 신약 평가 플랫폼 구축
기 여 율	1/2
과제수행기관명	가톨릭대학교(성의교정)
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

배양액이 주입되는 주입부, 상기 배양액이 배출되는 배출부, 상기 주입부와 상기 배출부 사이에 배치되는 하나 이상의 마이크로웰 (microwell), 및 상기 마이크로웰의 상부에 배치되는 유로부를 포함하는 오가노이드 칩;

상기 오가노이드 칩의 주입부와 직접 또는 간접적으로 연결되어 상기 유로부에 10 내지 50 μL /분의 유속으로 배양액을 공급하는 펌프; 및

상기 오가노이드 칩의 배출부와 직접 또는 간접적으로 연결되고 상기 유로부를 통과한 배양액이 저장되는 배양액 저장소;

를 포함하는, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마이크로웰의 내주면 및 유로부 하측면은 코팅층을 포함하고,

상기 코팅층은 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM)을 포함하는 것인, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 세포외기질은 1.0 내지 2.0 % (v/v) 겔트렉스 (Geltrex) 또는 80 내지 120 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물인 것인, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서, 마이크로웰의 내주면은 원통형 형상인 것인, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 마이크로웰의 직경은 1.2 내지 1.8 mm인 것인, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 마이크로웰의 높이는 0.1 내지 0.5 mm인 것인, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 오가노이드 칩은 폴리디메틸실록산 (Polydimethylsiloxane; PDMS)을 포함하는 것인, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 폴리디메틸실록산의 단량체 및 경화제 비율은 5:1 내지 15:1인 것인, 오가노이드 배양 시스템.

청구항 9

분화된 오가노이드를 오가노이드 칩의 유로부 하측에 배치된 마이크로웰 (microwell)에 시딩 (seeding)하는 시딩 단계; 및

상기 오가노이드 칩과 연결된 펌프를 이용하여 상기 유로부에 10 내지 50 μL /분의 유속으로 배양액을 공급하여 상기 오가노이드 표면에 전단응력 (shear stress)을 발생시켜 혈관 형성을 유도하는 혈관형성 유도 단계;

를 포함하는 오가노이드 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 오가노이드는 신장 오가노이드인 것인, 오가노이드 생산방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 방법은 상기 시딩 단계 이전에 상기 마이크로웰의 내주면 및 유로부 하측면을 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM)로 코팅하는 코팅 단계를 더 포함하는 것인, 오가노이드 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 세포외기질은 1.0 내지 2.0 % (v/v) 겔트렉스 (Geltrex) 또는 80 내지 120 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF)를 포함하는 것인, 오가노이드 생산방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 시딩 단계는 1.2 내지 1.8 mm의 직경을 갖는 마이크로웰에 오가노이드를 시딩하는 것인, 오가노이드 생산방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 시딩 단계는 0.1 내지 0.5 mm의 높이를 갖는 마이크로웰에 오가노이드를 시딩하는 것인, 오가노이드 생산방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 혈관형성 유도 단계는 상기 유로부에 20 내지 30 μ L/분의 유속으로 배양액을 공급하여 혈관 형성을 유도하는 것인, 오가노이드 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈관화된 신장 오가노이드 형성을 위한 세포기질의 최적화 및 오가노이드 칩에 관한 것으로, 구체적으로는, 오가노이드 중심부의 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포 괴사를 방지하기 위한 오가노이드 배양 시스템 및 이를 이용한 오가노이드 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신약 개발 과정에 있어서 임상시험을 함에 앞서 인간과 유사한 동물에 대한 동물실험이 요구된다. 쥐, 토끼 등의 동물이 동물실험에 이용되는데, 이에 대한 윤리가 문제된다. 또한, 동물실험 모델은 인체와 유전적 또는 생물학적인 특성이 상이하기 때문에 기존 약물 테스트는 동물실험에서 발견되지 않았던 부작용이 인간에게서 발견되는 등 약물 시험 반응의 신뢰성에 한계가 있다는 문제가 있다.

[0003] 신약 개발 과정에 있어 이러한 문제점을 보완하기 위한 여러 방안이 연구되고 있다. 그러나 종래의 2D 세포주 배양법은 조직 고유의 성질 및 특성을 재현해 내기 힘들다는 단점이 있고, 이에 대한 대안으로 암 환자 유래 이종 이식 모델이 활용되기도 하지만 대규모 약물 스크리닝에는 부적합하다는 단점이 있다. 따라서, 최근 오가노이드를 이용한 실험 방법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0004] 오가노이드는 줄기세포를 3차원적으로 배양하거나 재조합해 만든 장기유사체로, 다양한 체내 기관에서 유래하며 안에 줄기세포가 포함되어 있어 세포체로 분화할 수 있는 집합체를 형성한다. 또한 체내 각 기관에서 유래한 오가노이드들은 해당 기관과 매우 유사한 구조로 되어 있어, 세포 및 동물실험을 대체할 수 있는 모델로 사용될 수 있다.

[0005] 그러나 오가노이드 모델은 세포 집합체로서 2D 세포보다 크기가 매우 크기 때문에 중심부에서의 양분 및 산소 결핍으로 인하여 세포의 괴사 문제가 발생한다.

[0006] 인간 장기 모사 모델로서 정확한 약물 반응이나 질환 표현형을 재현하려면 성체와 유사한 수준의 성숙화된 오가노이드가 필요하지만, 현재 대부분의 오가노이드 유도 및 2차원적인 배양 방법은 성숙한 오가노이드로 분화하기 전에 오가노이드가 괴사하거나 미성숙한 상태로 존재한다는 한계점을 갖고 있다. 따라서 성숙한 오가노이드로서의 기능 향상과 성숙화를 위한 혈관 네트워크의 형성은 매우 필수적이라고 할 수 있다.

[0007] 본 발명자들은 오가노이드 중심부에서의 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포의 괴사 문제를 해결하고자 연구한 결과, 종래 오가노이드 칩이 오가노이드 혈관화 유도를 위하여 생화학적인 자극만을 이용하던 것에 추가적으로 전단응력 (shear stress)을 발생시켜 효율적으로 양분 및 산소를 공급할 수 있는 오가노이드 배양 시스템 및 이를 이용한 오가노이드 생산방법을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 오가노이드 중심부의 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포 괴사를 방지하기 위한 미세 유체 시스템을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과 전단응력 (shear stress)을 이용하는 미세 유체 시스템을 개발하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포 괴사를 방지하며 오가노이드를 생산할 수 있는 오가노이드 배양 시스템을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 전단응력을 발생시켜 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포 괴사를 방지하는 오가노이드 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 오가노이드 중심부의 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포 괴사를 방지하기 위한 미세 유체 시스템에 관한 것에 관한 것이다.

[0012] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0013] 본 발명의 일 양태는, 배양액이 주입되는 주입부, 배양액이 배출되는 배출부, 주입부와 배출부 사이에 배치되는 하나 이상의 마이크로웰 (microwell), 및 마이크로웰의 상부에 배치되는 유로부를 포함하는 오가노이드 칩; 오가노이드 칩의 주입부와 직접 또는 간접적으로 연결되어 유로부에 10 내지 50 μL /분의 유속으로 배양액을 공급하는 펌프; 및 오가노이드 칩의 배출부와 직접 또는 간접적으로 연결되고 유로부를 통과한 배양액이 저장되는 배양액 저장소;를 포함하는, 오가노이드 배양 시스템이다.

[0014] 본 명세서상 용어 "오가노이드 (organoid)"는 줄기세포를 이용해 최소 기능을 할 수 있도록 만든 미니 유사 장기로, 동물 등에서 수집 또는 취득하지 않고 인공적인 배양 과정을 통해 제조한 신경, 장 등을 의미하며, 이를 구성하는 세포의 유래는 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에서, 오가노이드는 인간 만능줄기세포를 배양하여 제조할 수 있는 것으로, 파킨슨병 유래의 유도만능 줄기세포로부터 신경외배엽 구체 형태로 분화되는 것, 파킨슨병 유래의 유도만능 줄기세포로부터 진정 내배엽 또는 후장으로 단계별로 분화될 수 있는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다

[0016] 본 발명의 일 구현예에서, 오가노이드는 종양 오가노이드, 장 오가노이드, 뇌 오가노이드, 간 오가노이드, 폐 오가노이드, 위 오가노이드, 신장 오가노이드, 장관 오가노이드, 허 오가노이드, 갑상선 오가노이드, 흉선 오가노이드, 정소 오가노이드, 췌장 오가노이드, 상피 오가노이드, 낭배 오가노이드, 배반포 오가노이드, 심장 오가노이드, 또는 망막 오가노이드일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에서, 오가노이드 배양 시스템은 신장 오가노이드를 생산하기 위한 것일 수 있고, 신장 오가노이드는 신체내 장기와 유사한 근위 세뇨관, 사구체 및 혈관 구조를 가질 수 있고, 추가적으로 관류가 가능한 혈관 및 집합관을 형성하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에 따른 오가노이드 칩은 배양액이 주입되는 주입부, 배양액이 배출되는 배출부, 주입부와 배출부 사이에 배치되는 하나 이상의 마이크로웰 및 마이크로웰의 상부에 배치되는 유로부를 포함할 수 있고, 그 외에 추가적인 구성을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에서, 오가노이드 칩은 폴리디메틸실록산 (Polydimethylsiloxane; PDMS)을 구성성분으로 포함할 수 있으며, 폴리디메틸실록산의 단량체와 경화제 비율은 1:1 내지 20:1일 수 있고, 예를 들어, 단량체와 경화제의 비율은 2.5:1, 5:1, 또는 10:1일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에서, 배양액은 오가노이드 칩의 주입부로부터 유로부를 통과하여 배출부 방향으로 일정 유속을 가지고 흐를 수 있고, 이는 일방향적일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 마이크로웰의 상부에는 유로부가 배치될 수 있고, 배양액은 주입부, 유로부, 및 배출부를 통과하는 과정에서 일정량이 마이크로웰로 공급되어, 배양할 오가노이드에 양분 및 산소를 공급한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에서, 오가노이드 칩이 포함하는 마이크로웰의 개수는 하나 이상일 수 있으며, 예를 들어, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 또는 40개일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에서, 하나 이상의 마이크로웰(110)은 오와 열을 맞춘 배열, 지그재그로 엇갈린배열, 또는 무작위 배열로 배치될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에서, 하나 이상의 마이크로웰은 가운데에 일렬로 배치되어 있을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에서, 하나 이상의 마이크로웰은 2 이상의 열로 배치되어 있을 수 있으며, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 열로 배치될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에서, 오가노이드 칩은 2열 5행의 총 10개의 마이크로웰을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에서, 마이크로웰의 내주면은 원통형, 복수의 면에 의해 구성된 다면체, 역원뿔형 또는 역각뿔형, 또는 이들 중 2개 이상을 조합한 형상일 수 있고, 예를 들어, 직방체, 육각기둥, 팔각기둥, 역삼각뿔형, 역사각뿔형, 역오각뿔형, 역육각뿔형, 또는 칠각 이상의 역다각뿔형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에서, 마이크로웰의 직경은 0.6 내지 2.1 mm, 0.6 내지 1.8mm, 0.6 내지 1.5 mm, 0.6 내지 1.2 mm, 0.6 내지 0.9 mm, 0.9 내지 2.1 mm, 0.9 내지 1.8mm, 0.9 내지 1.5 mm, 0.9 내지 1.2 mm, 1.2 내지 2.1 mm, 1.2 내지 1.8mm, 1.2 내지 1.5 mm, 1.5 내지 2.1 mm, 1.5 내지 1.8mm, 또는 1.8 내지 2.1 mm일 수 있으며, 예를 들어, 1.2 내지 1.8mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에서, 마이크로웰의 높이는 0.1 내지 2.0 mm, 0.1 내지 1.5 mm, 0.1 내지 1.0 mm, 0.1 내지 0.5 mm, 0.5 내지 2.0 mm, 0.5 내지 1.5 mm, 0.5 내지 1.0 mm, 1.0 내지 2.0 mm, 1.0 내지 1.5 mm, 또는 1.5 내지 2.0 mm일 수 있으며, 예를 들어, 0.1 내지 0.5 mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에서, 마이크로웰의 내주면 및/또는 유로부 하측면은 코팅층을 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 마이크로웰의 내주면 및/또는 유로부 하측면의 코팅층은 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에서, 세포외기질은 0.5 내지 3.0 % (v/v) 겔트렉스 (Geltrex) 및 80 내지 200 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에 따른 펌프는 배양액을 오가노이드 칩으로 공급하는 역할을 하며, 일정한 유량 및 유속으로 배양액을 공급할 수 있으며, 사용자가 설정하는 유량 및 유속으로 변경하여 배양액을 공급할 수 있다.
- [0034] 펌프에서 공급하는 배양액의 유속은 1 내지 100 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 20 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 10 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 5 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 100 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 20 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 10 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 100 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 20 $\mu\text{L}/\text{분}$, 20 내지 100 $\mu\text{L}/\text{분}$, 20 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 20 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 20 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 30 내지 100 $\mu\text{L}/\text{분}$, 30 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 30 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 40 내지 100 $\mu\text{L}/\text{분}$, 40 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 또는 50 내지 100 $\mu\text{L}/\text{분}$ 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 다른 양태는, 분화된 오가노이드를 오가노이드 칩의 유로부 하측에 배치된 마이크로웰 (microwell)에 시딩 (seeding)하는 시딩 단계; 및 오가노이드 칩과 연결된 펌프를 이용하여 유로부에 10 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$ 의 유속으로 배양액을 공급하여 오가노이드 표면에 전단응력 (shear stress)을 발생시켜 혈관 형성을 유도하는 혈관 형성 유도 단계;를 포함하는 오가노이드 생산방법이다.
- [0036] 본 명세서상 용어 "전단응력"은 물체의 표면에 평행한 방향으로 작용하는 응력을 의미한다. 유체의 경우, 운동하고 있는 유체가 고체 면과 접촉하게 되면 유체의 점성에 의해 경계면에서 내부저항을 받으며 흐르게 되는데 이때 경계면에서 작용하는 단위면적당의 마찰력을 전단응력이라 하며, 유체의 점성계수에 많은 영향을 받는다.

- [0037] 본 발명에 따른 시딩 단계는 분화된 오가노이드를 마이크로웰 하부에 시딩하는 것으로, 시딩하는 오가노이드는 예를 들어, 오가노이드는 종양 오가노이드, 장 오가노이드, 뇌 오가노이드, 간 오가노이드, 폐 오가노이드, 위 오가노이드, 신장 오가노이드, 장관 오가노이드, 허 오가노이드, 갑상선 오가노이드, 흉선 오가노이드, 정소 오가노이드, 췌장 오가노이드, 상피 오가노이드, 낭배 오가노이드, 배반포 오가노이드, 심장 오가노이드, 또는 망막 오가노이드일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에서, 시딩 단계에서 오가노이드가 시딩되는 마이크로웰의 직경은 0.6 내지 2.1 mm, 0.6 내지 1.8mm, 0.6 내지 1.5 mm, 0.6 내지 1.2 mm, 0.6 내지 0.9 mm, 0.9 내지 2.1 mm, 0.9 내지 1.8mm, 0.9 내지 1.5 mm, 0.9 내지 1.2 mm, 1.2 내지 2.1 mm, 1.2 내지 1.8mm, 1.2 내지 1.5 mm, 1.5 내지 2.1 mm, 1.5 내지 1.8mm, 또는 1.8 내지 2.1 mm일 수 있으며, 예를 들어, 1.2 내지 1.8mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예에서, 시딩 단계에서 오가노이드가 시딩되는 마이크로웰의 높이는 0.1 내지 2.0 mm, 0.1 내지 1.5 mm, 0.1 내지 1.0 mm, 0.1 내지 0.5 mm, 0.5 내지 2.0 mm, 0.5 내지 1.5 mm, 0.5 내지 1.0 mm, 1.0 내지 2.0 mm, 1.0 내지 1.5 mm, 또는 1.5 내지 2.0 mm일 수 있으며, 예를 들어, 0.1 내지 0.5 mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에 따른 혈관형성 유도 단계는 펌프로부터 공급되는 배양액을 특정 유속으로 공급함으로써 오가노이드에 화학적인 자극뿐만 아니라 기계적인 자극을 동시에 적용함으로써 혈관 형성을 유도하는 것으로, 배양액의 유속은 1 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 20 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 10 $\mu\text{L}/\text{분}$, 1 내지 5 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 20 $\mu\text{L}/\text{분}$, 5 내지 10 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 10 내지 20 $\mu\text{L}/\text{분}$, 20 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 20 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 20 내지 30 $\mu\text{L}/\text{분}$, 30 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$, 30 내지 40 $\mu\text{L}/\text{분}$, 또는 40 내지 50 $\mu\text{L}/\text{분}$ 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예에서, 혈관형성 유도 단계는 신장 오가노이드의 혈관형성을 유도하는 단계일 수 있으며, 구체적으로 배양액을 특정 유속으로 공급함으로써 신장 오가노이드에 다리세포 (Podocyte) 및 혈관을 형성시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 일 구현예에서, 오가노이드 생산방법은 시딩 단계 전에 배양할 단일세포를 선택하고 플레이팅하는 플레이팅 단계; 및/또는 단일세포를 오가노이드로 분화시키는 분화 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예에서, 분화 단계는 플레이팅된 단일세포를 캐비테이션 스페로이드 (Cavitated Spheroids), 중간엽 (Mesenchyme), 또는 관형 오가노이드 (Tubular Organoids)의 형태로 분화되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에서, 분화 단계는 인간 iPSC 세포인 The WTC11 iPSC 세포를 배양하여 신장 오가노이드로 분화되는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서 배양 및 분화되는 세포의 계대수는, 예를 들어, 40 내지 50일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에서, 시딩 단계 이전에 마이크로웰의 내주면 및/또는 유로부 하측면을 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM)로 코팅하는 코팅 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에서, 마이크로웰의 내주면 및/또는 유로부 하측면에 코팅되는 세포외기질은 1.0 내지 2.0 % (v/v) 겔트렉스 (Geltrex) 및 80 내지 120 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명에 따른 오가노이드 생산 방법은 전술한 본 발명의 오가노이드 칩을 이용하여 수행될 수 있으며, 이에, 전술한 오가노이드 칩과 중복되는 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 회피하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

- [0049] 본 발명은 혈관화된 신장 오가노이드 형성을 위한 세포기질의 최적화 및 오가노이드 칩에 관한 것으로, 구체적으로는, 오가노이드 중심부의 양분 및 산소 결핍으로 인한 세포 괴사를 방지하기 위한 오가노이드 배양 시스템 및 이를 이용한 오가노이드 생산방법에 관한 것이다.

[0050] 본 발명은 다음과 같은 장점을 갖는다. 1) 배양할 오가노이드에 화학적인 자극뿐만 아니라 기계적인 자극을 동시에 가하여 간단한 방법으로 혈관이 형성되는 신장 오가노이드를 생산할 수 있다. 2) 인체와 유사한 오가노이드를 생산함으로써 인체내 반응과 유사한 약물 반응을 신속하고 저비용으로 수행할 수 있다. 3) 다른 장기의 오가노이드에도 이와 같은 방법으로 혈관 형성을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 오가노이드 배양 시스템의 개략도이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 오가노이드 칩(100)의 확대도이다.
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 마이크로웰(110) 및 유로부(120)의 단면도이다.
 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 신장 오가노이드 배양과정 프로토콜 개략도이다.
 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른, 오가노이드 칩 내부의 속도장 시뮬레이션 결과이다.
 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른, 오가노이드의 주변 유속을 파악하기 위한 시뮬레이션 결과이다.
 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른, 마이크로웰 및 유로부에서의 배양액 흐름을 나타낸다.
 도 5d는 본 발명의 일 실시예에 따라, 오가노이드 표면에 작용하는 벽 전단응력을 측정한 시뮬레이션 결과이다.
 도 5e는 본 발명의 일 실시예에 따라, 마이크로웰의 직경을 증가시키며 측정한 벽 전단응력 그래프이다.
 도 5f는 본 발명의 일 실시예에 따라, 마이크로웰의 높이를 증가시키며 측정한 벽 전단응력 그래프이다.
 도 6a는 본 발명의 일 실시예에 따라, 혈관세포(PECAM1), 다리세포(NPHS1), 및 근위 세뇨관(LTL)이 형성된 신장 오가노이드를 면역형광 염색방법으로 나타낸 공초점(Confocal) 형광 현미경 이미지이다.
 도 6b 및 6c는 본 발명의 일 실시예에 따라, 신장 오가노이드에서 혈관세포(PECAM1), 다리세포(NPHS1), 및 근위 세뇨관(LTL)이 형성된 양을 나타낸 그래프이다.
 도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따라, 배양된 신장 오가노이드의 혈관세포(PECAM1), 다리세포(NPHS1), 및 근위 세뇨관(LTL)을 면역형광 염색방법으로 나타낸 공초점(Confocal) 형광 현미경 이미지이다.
 도 7b 및 7c는 본 발명의 일 실시예에 따라, 신장 오가노이드에서 혈관세포(PECAM1), 다리세포(NPHS1), 및 근위 세뇨관(LTL)이 형성된 양을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “%”는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 및 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0053] 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. 참고로, 본 설명에서 동일한 번호는 실질적으로 동일한 요소를 지칭하며, 상기 규칙 하에서 다른 도면에 기재된 내용은 인용하여 설명할 수 있고, 당업자에게 자명하다고 판단되거나 반복되는 내용은 생략될 수 있다.

[0055] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 오가노이드 배양 시스템(1000)의 개략도이다.

[0056] 오가노이드 배양 시스템(1000)은 오가노이드를 배양시키기 위한 장치 전반이다. 오가노이드 (organoid)는 줄기 세포를 이용해 최소 기능을 할 수 있도록 만든 미니 유사 장기로, 동물 등에서 수집 또는 취득되지 않고 인공적인 배양 과정을 통해 얻을 수 있으며, 이를 구성하는 세포의 유래는 제한되지 않는다.

[0057] 도 1을 참조하면, 일 실시예에 따른 오가노이드 배양 시스템은 오가노이드 칩(100), 펌프(200) 및 배양액 저장소(300)를 포함할 수 있다.

[0058] 오가노이드 칩(100)은 분화된 오가노이드를 배양하는 곳으로, 세포에 양분, 산소, 및 오가노이드가 배양되기 위한 기타 환경을 제공하는 장치이다.

[0059] 도 1에는 오가노이드 칩(100)이 전체적으로 납작한 사각기둥형으로 나타나 있으나, 오가노이드가 배양될 수 있

는 형태라면, 이에 한정되지 않고 자유롭게 선택될 수 있다.

- [0060] 오기노이드 칩(100)은 유리, 플라스틱 수지, 또는 폴리디메틸실록산 (PDMS)을 포함할 수 있다. 유리는 예를 들어 규산염 유리, 인산염 유리 또는 붕규산 유리일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 플라스틱 수지는, 예를 들어, 폴리디메틸실록산, 폴리우레탄, 폴리염화비닐, ABS, 폴리아세탈, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 변성 폴리페닐렌옥사이드, 폴리부틸렌 테레프탈레이트, 페놀수지, 불소수지, 폴리에스테르, 폴리이미드, 폴리아마이드 또는 폴리카보네이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 폴리디메틸실록산이 오가노이드 칩의 제작에 사용되는 경우, 폴리디메틸실록산의 단량체 및 경화제 비율은 5:1 내지 15:1일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 오기노이드 칩(100)은 하나 이상의 마이크로웰 (110), 유로부(120), 주입부(130) 및 배출부(140)를 포함할 수 있다.
- [0062] 도 1에는 오기노이드 칩(100)의 구조 및 배치관계 관련하여, 주입부(130) 및 배출부(140)가 오기노이드 칩(100)의 양 끝에 위치하고, 유로부(120)가 주입부(130) 및 배출부(140) 사이에 위치하며, 유로부(120) 하부에 하나 이상의 마이크로웰(110)이 위치하는 것으로 도시되어 있으나, 배양액이 주입부(130)로부터 주입되어 배출부(140)로 배출됨으로써 유속을 발생시킬 수 있는 구조라면, 이에 한정되지 않고 자유롭게 설계될 수 있다.
- [0063] 주입부(130)는 배양액이 펌프(200)로부터 오가노이드 칩(100)으로 공급되는 통로이며, 배양액이 새어나오지 않고 일정한 유량 및 유속으로 공급될 수 있도록 제1연결부(250)와 같은 크기를 가질 수 있고, 배양액이 안정적으로 주입될 수 있는 형태라면 제한되지 않고 선택될 수 있다.
- [0064] 도 1에는 주입부(130)가 오기노이드 칩(100)의 일측에 배치되는 것으로 도시되어 있으나 이는 일 예에 불과하고, 주입부(130)는 오기노이드 칩(100)내 어느 위치에나 배치될 수 있는 것으로 해석될 수 있다.
- [0065] 주입부(130) 단면의 모양은 원형일 수 있으나, 배양액의 누수가 없는 모양이라면, 이에 한정되지 않고 자유롭게 선택될 수 있다.
- [0066] 배출부(140)는 오가노이드 칩(100)을 통과한 배양액이 배출되는 통로이며, 오가노이드 칩(100)내에서 배양액의 흐름(50)을 발생시킬 수 있고, 배양액이 새어나오지 않고 일정한 유량 및 유압으로 배출될 수 있도록 제2연결부(350)와 같은 크기를 가질 수 있고, 배양액을 배출할 수 있는 형태라면 제한되지 않고 선택될 수 있다.
- [0067] 도 1에는 배출부(140)가 오기노이드 칩(100)의 타측에 배치되는 것으로 도시되어 있으나 이는 일 예에 불과하고, 배출부(140)는 오기노이드 칩(100)내 어느 위치에나 배치될 수 있는 것으로 해석될 수 있다.
- [0068] 배출부(140) 단면의 모양은 원형일 수 있으나, 배양액의 누수가 없는 모양이라면, 이에 한정되지 않고 자유롭게 선택될 수 있다.
- [0069] 주입부(130)는 제1공급부(250)와 동일한 직경을 가질 수 있고, 배출부(140)는 제2공급부(350)와 동일한 직경을 가질 수 있으며, 주입부(130) 및 배출부(140)의 직경은 동일할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 유로부(120)는 펌프(200)로부터 공급되는 배양액이 오가노이드 칩(100)의 주입부(130)로 유입되어 배출부(140)로 배출되기까지의 경로로, 유로부(120)내에는 배양액의 흐름(50)이 발생될 수 있다.
- [0071] 유로부(120)는 오가노이드가 배양되는 마이크로웰(110)의 상부에 배치되어 마이크로웰(110)에 배양액을 지속적으로 공급할 수 있다.
- [0072] 마이크로웰(110)은 분화된 오가노이드를 배양하는 곳으로, 사용자는 마이크로웰의 상부, 중부, 또는 하부에 배양할 오가노이드를 위치시키고 펌프(200)를 통해 배양액을 공급하여 오가노이드를 배양할 수 있다.
- [0073] 도 1에는 마이크로웰(110)의 상부에는 유로부(120)에 배치되어 있는 것으로 도시되어 있으나 이는 일 예에 불과하고, 유로부(120)는 마이크로웰(110)의 상부에, 하부에, 측면에, 또는 중앙을 관통하여 배치될 수 있는 것으로 해석될 수 있다.
- [0074] 오가노이드 칩(100)내 마이크로웰(110)의 개수는 하나 이상일 수 있으며, 예를 들어, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 또는 40개일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 복수의 마이크로웰(110)은 오와 열을 맞춘 배열, 지그재그로 엇갈린배열, 또는 무작위 배열로 배치될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0076] 도 1에는 2열 5행의 총 10개의 마이크로웰(110)이 오와 열을 맞추어 배열하는 것으로 도시되어 있으나 이는 일 예

에 불과하고, 마이크로웰(110)의 개수 및 배열에는 제한이 없다.

- [0077] 펌프(200)는 사용자가 설정하는 유량 및 유속으로 배양액을 공급할 수 있으며, 펌프로부터 공급되는 배양액은 제1연결부(250) 및/또는 주입부(130)를 통하여 오가노이드 칩(100)에 지속적으로 공급될 수 있다.
- [0078] 펌프(200)는 일정한 유량 및 유속으로 배양액을 공급할 수 있는 것이라면 자유롭게 선택될 수 있고, 예를 들어, 실린지 펌프, 인퓨전 펌프, 예를 들어, 듀얼 인퓨전 펌프 또는 싱글 인퓨전일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0079] 펌프(200)는 오가노이드 칩(100)의 주입부(130)와 직접 또는 간접적으로 연결되는 구조로 되어있을 수 있다. 직접적으로 연결되는 구조는 오가노이드 칩(100)과 펌프(200)가 직접 연결되어 맞닿을 수 있는 구조일 수 있다. 간접적으로 연결되는 구조는 오가노이드 칩(100)과 펌프(200)가 제1연결부(250)를 통해 연결되는 구조일 수 있다.
- [0080] 도 1에는 오가노이드 칩(100)과 펌프(200)가 제1연결부(250)를 통해 연결되어 있는 구조가 도시되어 있으나 이는 일 예에 불과하고, 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 제1연결부(250)는 배양액을 누수없이 이동시킬 수 있는 것이라면 제한이 없고, 예를 들어, 튜브일 수 있고, 구체적으로는, 타이곤 튜브 (Tygon Tube)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0082] 배양액 저장소(300)는 배양액이 오가노이드 칩(100)을 통과한 후 저장되는 곳으로, 펌프(200)로부터 공급되는 새로운 배양액이 일정한 유량 및 유속으로 마이크로웰(110)에 공급될 수 있도록, 오가노이드 칩(100)으로부터 배출된 배양액을 저장할 수 있는 공간으로써 기능할 수 있다.
- [0083] 배양액 저장소(300)는 배양액을 저장할 수 있는 것이라면 자유롭게 선택될 수 있고, 예를 들어, 시험관, 삼각 플라스크, 둥근 바닥 플라스크, 또는 가지플라스크일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0084] 배양액 저장소(300)는 오가노이드 칩(100)의 배출부(140)와 직접 또는 간접적으로 연결되는 구조일 수 있다. 직접적으로 연결되는 구조는 오가노이드 칩(100)과 배양액 저장소(300)가 연결되어 직접 맞닿는 구조일 수 있다. 간접적으로 연결되는 구조는 오가노이드 칩(100)과 배양액 저장소(300)가 제2연결부(350)를 통해 연결될 수 있는 구조일 수 있다.
- [0085] 도 1에는 오가노이드 칩(100)과 배양액 저장소(300)가 제2연결부(350)를 통해 연결되어 있는 구조가 도시되어 있으나 이는 일 예에 불과하고, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 제2연결부(350)는 배양액을 누수없이 이동시킬 수 있는 것이라면 제한이 없고, 예를 들어, 튜브일 수 있고, 구체적으로, 타이곤 튜브 (Tygon Tube)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0087] 배양액은 펌프(200)로부터 공급되어 제1연결부(250), 주입부(130), 유로부(120), 마이크로웰(110), 배출부(140), 또는 제2연결부(350)를 통과하여 배양액 저장소(300)로 배출되는 흐름(50)을 가질 수 있다.
- [0088] 도면에는 도시되지 않았지만, 제2연결부(350)는 Y자형 튜브일 수 있고, Y자형 튜브의 일측은 배양액 저장소(300)에 연결될 수 있고 타측은 제1연결부(250), 주입부(130) 또는 유로부(120)에 연결될 수 있어, 배양액이 제1연결부(250), 주입부(130), 유로부(120), 마이크로웰(110), 배출부(140), 또는 제2연결부(350)를 1회 이상 통과하여 순환하는 흐름(50)을 가질 수 있다.
- [0089] 도 1에는 배양액이 펌프(200), 제1연결부(250), 주입부(130), 유로부(120), 마이크로웰(110), 배출부(140), 제2연결부(350), 또는 배양액 저장소(300)를 1회 통과하는 흐름(50)을 도시하고 있으나 이는 일 예에 불과하고, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 오가노이드 칩(100)의 확대도이다.
- [0091] 도 2를 참조하면, 일 실시예에 따른 오가노이드 칩(100)은 하나 이상의 마이크로웰(110), 유로부(120), 주입부(130) 및 배출부(140)를 포함할 수 있다.
- [0092] 마이크로웰(110)은 특정한 형상, 일정한 직경 또는 높이를 가질 수 있다.
- [0093] 각각의 마이크로웰(110)은 서로 동일한 특정한 형상, 일정한 직경 또는 높이를 가질 수 있고, 서로 상이한 특정한 형상, 일정한 직경 또는 높이를 가질 수 있다. 또는, 각각의 마이크로웰은 서로 일부만 동일한 특정한 형상, 일정한 직경 또는 높이를 가질 수 있다.

- [0094] 마이크로웰(110)의 내주면은 원통형, 복수의 면에 의해 구성된 다면체, 역원뿔형 또는 역각뿔형, 또는 이들 중 2개 이상을 조합한 형상일 수 있고, 예를 들어, 직방체, 육각기둥, 팔각기둥, 역삼각뿔형, 역사각뿔형, 역오각뿔형, 역육각뿔형, 또는 칠각 이상의 역다각뿔형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0095] 도 2에는 마이크로웰(110)의 내주면이 원통형인 것으로 도시되어 있으나 이는 일 예에 불과하고, 오가노이드(150)가 배양될 수 있는 형태라면 제한없이 선택될 수 있다.
- [0096] 마이크로웰(110)에 시딩 (Seeding)되는 오가노이드(150)는 세포의 유래가 제한되지 않으며, 예를 들어, 오가노이드는 종양 오가노이드, 장 오가노이드, 뇌 오가노이드, 간 오가노이드, 폐 오가노이드, 위 오가노이드, 신장 오가노이드, 장관 오가노이드, 혀 오가노이드, 갑상선 오가노이드, 흉선 오가노이드, 정소 오가노이드, 췌장 오가노이드, 상피 오가노이드, 낭배 오가노이드, 배반포 오가노이드, 심장 오가노이드, 또는 망막 오가노이드일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0097] 배양액은 주입부(130)로 유입되어 유로부(120)를 통과한 후 배출부(140)로 배출되는 흐름(50)을 가질 수 있으나, 이 중 일정량의 배양액은 유로부(120)의 하부에 배치된 마이크로웰(110)의 상부로 공급되어 마이크로웰(110)의 상부에서 오가노이드에 전단응력을 발생시킬 수 있다.
- [0098] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 마이크로웰(110) 및 유로부(120)의 단면도이다.
- [0099] 도 3을 참조하면, 일 실시예에 따른 유로부(120)는 마이크로웰(110)의 상부에 배치될 수 있으며, 유로부(120)의 하부는 마이크로웰(110) 상부와 연결되어 유로부(120)로부터 마이크로웰(110)로의 배양액 유입이 자유로울 수 있다.
- [0100] 마이크로웰(110)은 특정한 형상, 마이크로웰은 일정한 직경(110d) 또는 높이(110h)를 가질 수 있다.
- [0101] 마이크로웰의 직경(110d)은 오가노이드를 배양하기에 충분한 직경을 의미하며, 예를 들어, 0.6 내지 2.1 mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0102] 마이크로웰의 높이(110h)는 오가노이드를 배양하기에 충분한 높이를 의미하며, 예를 들어, 0.1 내지 2.0 mm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0103] 마이크로웰(110)의 내주면 및/또는 유로부(120) 하측면은 코팅층(111)을 포함할 수 있고, 코팅층(111)은 오가노이드에 생리학적 미세환경 구현해주고 유체 아래에서 안정화기 위한 것이라면 자유롭게 선택될 수 있으며, 예를 들어, 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0104] 코팅층(111)은 세포외기질을 포함할 수 있으며, 세포외기질은 겔트렉스 (Geltrex) 및/또는 혈관 내피 성장인자 (VEGF)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0105] 겔트렉스 (Geltrex)의 농도는 1.0 내지 2.0 % (v/v) 일 수 있고, 혈관 내피 성장인자 (VEGF)의 양은 80 내지 120 ng/ml일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0106] 유로부(120)를 통과하는 배양액은 마이크로웰(110)내의 오가노이드(150)에 전단응력을 발생시킬 수 있고, 발생되는 전단응력의 크기는 마이크로웰(110) 내주면의 형상, 마이크로웰의 직경(110d), 또는 마이크로웰의 높이(110h)의 의해 결정될 수 있다.
- [0107] 본 발명의 일 실시예에 따른 혈관형성 유도 단계에서, 배양액의 흐름으로 인해 발생한 전단응력은 오가노이드(150)에 다리세포 (151) 및/또는 혈관(152)을 형성시킬 수 있다.
- [0109] **실시예 1. 오가노이드 칩 제작**
- [0110] 오가노이드 칩은 3D 프린터 (DP120, WOW 3D, Korea)에서 제작한 금형(mold)을 이용하여 제작되었다. 이 금형은 오토캐드 소프트웨어 (AutoCAD software)로 설계되었으며, 모델링 데이터는 3D 프린팅 소프트웨어로 전송하였다.
- [0111] 그 후 UV 경화성 수지를 경화시켜 금형 제작을 진행하였다. 생성된 금형을 아이소프로필알코올 (IPA, Sigma Aldrich, USA)로 세척하고 공기로 건조했다. PDMS (Sylgard184, Dow Corning, USA)를 10 : 1 (단량체 : 경화제)의 비율로 혼합하여 제작된 금형에 붓고 80 ℃에서 2시간 동안 굳혔다. 경화된 PDMS 칩을 금형에서 조심스럽게 벗겨 내어 O₂ 플라즈마 처리 (Femto Scientific, Korea)하여 슬라이드 유리 (Marienfeld, Germany)에 접

작했다.

[0112] 그 후 유리에 접착된 PDMS 칩을 오븐에 1분 동안 넣어서 PDMS 칩과 유리의 접착력을 강화했다. 오가노이드 칩에서 입구와 출구를 뚫은 방식으로 배양액을 주입 및 배출하기 위한 주입부 및 배출부를 만들어 오가노이드 칩을 완성하였다. (도 2)

[0114] 실시예 2. 신장 오가노이드 배양

[0115] 혈관 형성이 유도된 신장 오가노이드를 배양할 수 있는 오가노이드 칩(을 고안하였다. 오가노이드 칩은 신장 오가노이드를 안정적으로 배양할 수 있도록, 열 개의 마이크로웰과 배양액이 흐르는 유로부를 포함한다.

[0116] 신장 오가노이드를 칩에 시딩(Seeding)하기 전에 1.5% (v/v) 겔트렉스 (Geltrex)에 VEGF(Vascular endothelial growth factor)를 100 ng/mL을 섞어 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 한 시간 코팅(111)했다. 이는 오가노이드에 생리학적 미세환경 (physicologycal microenviroment) 구현해주고 유체 아래에서 안정화기 위함이다.

[0117] 그 후, DPBS로 칩을 2번 세척하고 칩에 신장 오가노이드의 배양액을 채우고, 모든 기포를 제거했다.

[0118] 신장 오가노이드를 오가노이드 칩에 시딩하기 위한 준비를 마친 후, 24-웰 플레이트 (well Plate)에서 16일까지 분화시킨 신장 오가노이드를 떼어서 마이크로웰에 하나씩 총 10개를 시딩했다. 하나의 마이크로웰에 하나의 신장 오가노이드를 시딩함으로써 전단응력(shear stress)이 오가노이드의 혈관 형성에 미치는 영향을 보다 정확히 분석할 수 있게 되었다.

[0119] 마이크로 칩내의 주입부에 내경 1/16 인치의 타이곤튜브 (제1연결부)를 50 mL 펌프에 연결하여 10 μ L/분의 유속으로 배양액을 마이크로 칩에 공급하였다. 마이크로 칩 내의 배출부에도 타이곤튜브 (제2연결부)를 연결하여 배양액 저장소로 배양액을 배출시켰다. 이러한 방법으로 오가노이드 칩에서 신장 오가노이드를 총 6일 동안 배양하였다.

[0121] 실시예 3. 인간 iPSC 세포 배양 및 신장 오가노이드 분화

[0122] CMC11 iPSC는 한국 가톨릭대학교의 한 남성 기증자로부터 얻었고, 그 세포의 계대수는 20 내지 40 인 것으로 실험하였다. 신장 오가노이드 분화는 인간 iPSC를 24-웰 플레이트에 mTeSR1 배지 (Stem Cell Technologies) 및 10 μ M Y27632 (LC Laboratories)의 혼합물에서 1 % (v/v) 겔트렉스 (Thermo Fisher Scientific)로 코팅된 유리 플레이트상에 5,000 세포/웰의 밀도로 플레이팅 하였다 (시딩으로부터 3일 전).

[0123] 배지는 1.5 % (v/v) 겔트렉스가 코팅된 mTeSR1 (시딩으로부터 2일 전), mTeSR1 (시딩으로부터 1일 전), RPMI (Thermo Fisher Scientific) 및 12 μ M CHIR99021 (Tocris) (시딩 당일), RPMI 및 B27 서플먼트 (Thermo Fisher Scientific) (시딩 후 1.5일)의 순서로 교환하였고, 세포를 2 내지 3일 마다 공급하여 신장 오가노이드 분화를 촉진하였다.

[0124] 실시예 4에서의 인간 iPSC에서 신장 오가노이드로 분화 단계 및 오가노이드 칩에서 혈관 형성이 유도된 신장 오가노이드 배양 단계를 도 4에 도시하였다.

[0126] 실시예 4. 전단응력 측정 시뮬레이션 모델링

[0127] 오가노이드 칩 내부에서 오가노이드 표면에 작용하는 전단응력(shear stress) 프로파일을 조사하기 위해 COMSOL 프로그램을 사용하였다. (도 5a 및 b)

[0128] 입구 (inlet)는 10 μ L/분의 유량으로, 출구 (outlet)는 0의 압력으로, 나머지 면은 미끄러짐 없음 (no-slip)으로 지정하여 시뮬레이션을 하였다. 마이크로웰의 직경과 높이에 따른 전단응력의 변화를 측정하였다.

[0129] 오가노이드 표면에서 작용하는 전단응력의 프로파일을 측정하였으며, 그 결과를 도 5d에 도시하였다. 청색에서 적색으로 변화할수록 전단응력이 높아지는 것을 알 수 있었다.

[0130] 1, 5, 10, 20 또는 30 μ L/분의 각 유속에서 마이크로웰의 직경의 변화를 주면서 전단응력을 측정하였으며, 그 결과를 도 5e에 도시하였다. 마이크로웰의 직경이 1.5 mm일 때 전단응력이 가장 높음을 알 수 있었다.

[0131] 1, 5, 10, 20 또는 30 μL /분의 각 유속에서 마이크로웰의 높이의 변화를 주면서 전단응력을 측정하였으며, 그 결과를 도 5f에 도시하였다. 마이크로웰의 높이가 낮아질수록 전단응력이 상승함을 알 수 있었다.

[0132] 이와 같이 다양한 유속에서 전단응력의 측정을 위한 시뮬레이션을 했으며, 마이크로웰의 형상, 높이, 및 직경이 동일한 경우에는 같은 유선 (streamline)을 공유하기 때문에, 전단응력의 크기는 유속에 비례하는 상관관계를 가짐을 확인하였다. 도 5c에 도시된 바와 같이, 직경 1.5 mm와 높이 1 mm의 마이크로웰 내부에 와류가 발생함을 알 수 있었으며, 이 실험 결과를 반영하여 가장 높은 전단응력이 발생하는 형태의 오가노이드 칩을 제작하였다.

[0134] 실시예 5. 면역형광 분석 (Immunofluorescence analysis)

[0135] 면역 형광 분석을 하기 위해 오가노이드 칩에서 혈관 형성이 유도된 신장 오가노이드를 분화된지 22 일째에 고정하였다. 동일한 부피의 DPBS (Thermo Fisher Scientific) 및 4 % 파라포름알데하이드 (Electron Microscopy Sciences)를 30분 동안 배지에 첨가하여 고정하였고, 샘플을 DPBS로 3회 세척하였다.

[0136] 고정된 오가노이드 배양물을 5 % 당나귀 혈청 (Millipore) 및 0.3 % 트리온-엑스-100/PBS (Triton-X-100/PBS)에서 블락 (block)하였고, 1차 항체와 함께 3 % 소혈청알부민 (Sigma) 및 DPBS에서 밤새도록 배양한 후 세척하였으며, 알렉사플로어 (Alexa Fluor, Invitrogen) 2차 항체로 배양하고 세척한 후 벡타실드 (Vectashield) H-1000에서 DAPI로 염색 또는 마운팅 하였다.

[0137] 안티-LTL(Vector Labs FL-1321, 1:500 dilution), 안티-NPHS1(R&D AF4269, 1:500), 안티-CD31(R&D Systems AF3628, 1:200)의 1차 항체를 사용하였다.

[0138] 오가노이드 칩 내부의 세포외기질 (Extracellular matrix; ECM) 코팅층을 포함하는 마이크로웰에서 배양된 오가노이드 구조 분석을 수행하였다.

[0139] 코팅층을 포함하지 않는 경우 (대조군), 1.5 % (v/v) 겔트렉스를 포함하는 세포외기질로 코팅한 경우 (실험군 1), 또는 1.5 % (v/v) 겔트렉스 및 100 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물을 포함하는 세포외기질로 코팅한 경우 (실험군 2), 배양된 오가노이드를 면역형광 염색하여 측정된 공초점(Confocal) 형광 현미경 이미지를 도 6a에 도시하였다.

[0140] 대조군, 실험군 1, 및 실험군 2 각각의 배양된 오가노이드에서 전체 오가노이드 대비 신장 특이항체 양성부위 및 신장 특이항체 음성부위의 비율을 하기 표 1에 표기하고, 그 결과를 도 6b에 나타냈다.

표 1

	대조군	실험군 1	실험군 2
신장 특이항체 양성부위	49 (%)	50 (%)	71 (%)
신장 특이항체 음성부위	51 (%)	50 (%)	29 (%)

[0143] 표 1에서 확인할 수 있듯이, 대조군과 실험군 1에서는 전체 오가노이드 대비 규명된 세포의 비율이 50% 정도로 비슷하였다. 그러나 실험군 2에서는 전체 오가노이드 대비 신장 특이항체 양성부위의 비율이 71%까지 현저하게 증가함을 알 수 있었다. 즉, 1.5 % (v/v) 겔트렉스를 포함하는 세포외기질로 코팅하는 경우에는 배양효과에 큰 영향이 없으나, 1.5 % (v/v) 겔트렉스 및 100 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물을 포함하는 세포외기질로 코팅하는 경우 배양효과가 현저해짐을 알 수 있었다.

[0145] 대조군, 실험군 1, 및 실험군 2 각각의 배양된 오가노이드에서 혈관세포(PECAM1), 다리세포(151, NPHS1), 및 근 유 세뇨관(LTL)이 형성된 양을 백분율로 나타내 하기 표 2에 표기하고, 그 결과를 도 6c에 나타냈다.

표 2

	대조군	실험군 1	실험군 2
혈관세포 비율	0.25 (%)	0.33 (%)	0.53 (%)
다리세포 비율	25.33 (%)	15.77 (%)	22.11 (%)

근위 세노관 비율	23.8 (%)	33.96 (%)	48.45 (%)
-----------	----------	-----------	-----------

[0148] 표 2에서 확인할 수 있듯이, 전체 오가노이드 대비 신장 특이항체 양성부위 중 혈관세포 비율 및 근위 세노관 비율은 대조군, 실험군 1 및 실험군 2에서 점차적으로 증가하였다. 반면에, 다리세포 비율은 대조군과 실험군 2에서 비슷한 수준을 나타냈다. 즉, 배양되는 혈관세포 및 근위 세노관의 비율은 1.5 % (v/v) 겔트렉스를 포함하는 세포외기질로 코팅한 경우에는 증가하고, 1.5 % (v/v) 겔트렉스 및 100 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물을 포함하는 세포외기질로 코팅한 경우에는 더욱 증가함을 알 수 있었다.

[0150] 다음으로, 배양액을 10 μ L/분의 유속으로 공급하였을 때 배양된 오가노이드 구조 분석을 수행하였다.

[0151] 코팅층을 포함하지 않는 경우 (대조군), 또는 1.5 % (v/v) 겔트렉스 및 100 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물을 포함하는 세포외기질로 코팅한 경우 (실험군), 배양된 오가노이드(150)를 면역형광 염색하여 측정된 공초점(Confocal) 형광 현미경 이미지를 도 7a에 도시하였다.

[0152] 대조군 및 실험군의 배양된 오가노이드에서 전체 오가노이드 대비 신장 특이항체 양성부위 및 신장 특이항체 음성부위의 비율을 하기 표 3에 표기하고, 그 결과를 도 7b에 나타냈다.

표 3

[0153]

	대조군	실험군
신장 특이항체 양성부위	64.48 (%)	61.36 (%)
신장 특이항체 음성부위	35.52 (%)	38.64 (%)

[0155] 표 3에서 확인할 수 있듯이, 배양액을 10 μ L/분의 유속으로 공급하였을 때는 대조군과 실험군간에 전체 오가노이드 대비 신장 특이항체 양성부위 비율의 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었다.

[0157] 대조군 및 실험군의 배양된 오가노이드에서 혈관세포(PECAM1), 다리세포(NPHS1), 및 근위 세노관(LTL)이 형성된 양을 백분율로 나타내 하기 표 4에 표기하고, 그 결과를 도 7c에 나타냈다.

표 4

[0158]

	대조군	실험군
혈관세포 비율	0.19 (%)	9.3 (%)
다리세포 비율	15.32 (%)	20.74 (%)
근위 세노관 비율	48.97 (%)	31.32 (%)

[0160] 표 4에서 확인할 수 있듯이, 전체 오가노이드 대비 신장 특이항체 양성부위 중 혈관세포 비율 및 근위 다리세포 비율은 1.5 % (v/v) 겔트렉스 및 100 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물을 포함하는 세포외기질로 코팅한 경우에는 증가하였다. 반면에, 근위 세노관 비율은 1.5 % (v/v) 겔트렉스 및 100 ng/ml 혈관 내피 성장인자 (VEGF) 혼합물을 포함하는 세포외기질로 코팅한 경우에는 감소하였다.

부호의 설명

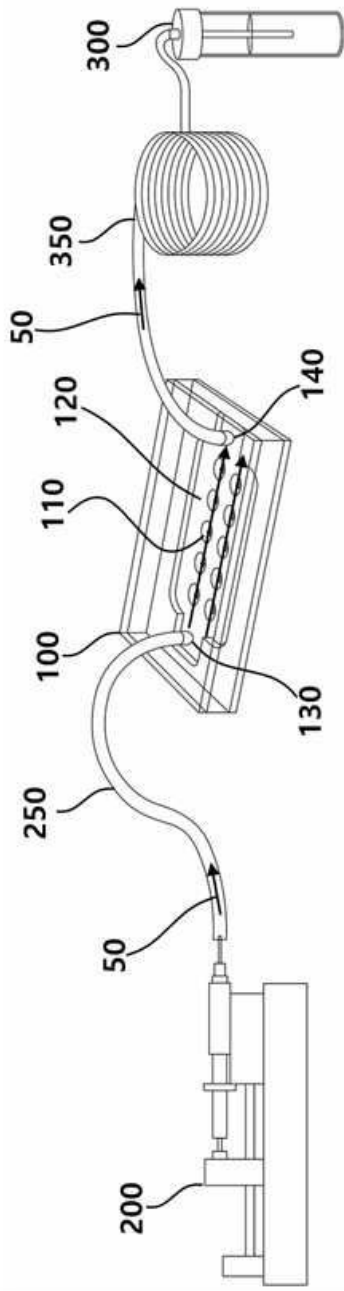
[0162] 100: 오가노이드 칩

- 110: 마이크로웰
- 111: 코팅층
- 120: 유로부
- 130: 주입부
- 140: 배출부
- 150: 오가노이드
- 151: 다리세포 (Podocyte)
- 152: 혈관
- 200: 펌프
- 250: 제1연결부
- 300: 배양액 저장소
- 350: 제2연결부
- 1000: 오가노이드 배양 시스템

도면

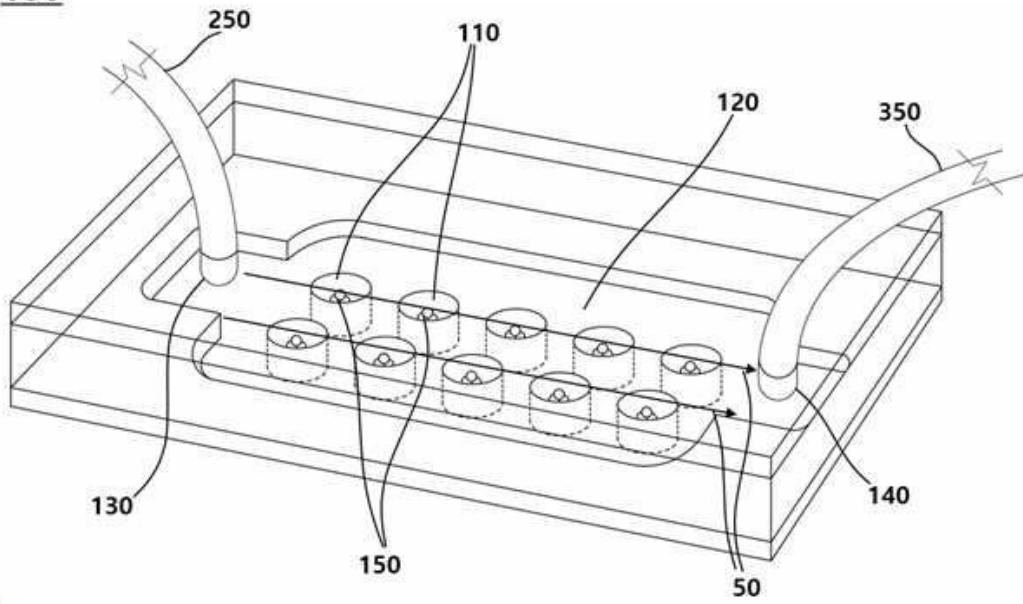
도면1

1000



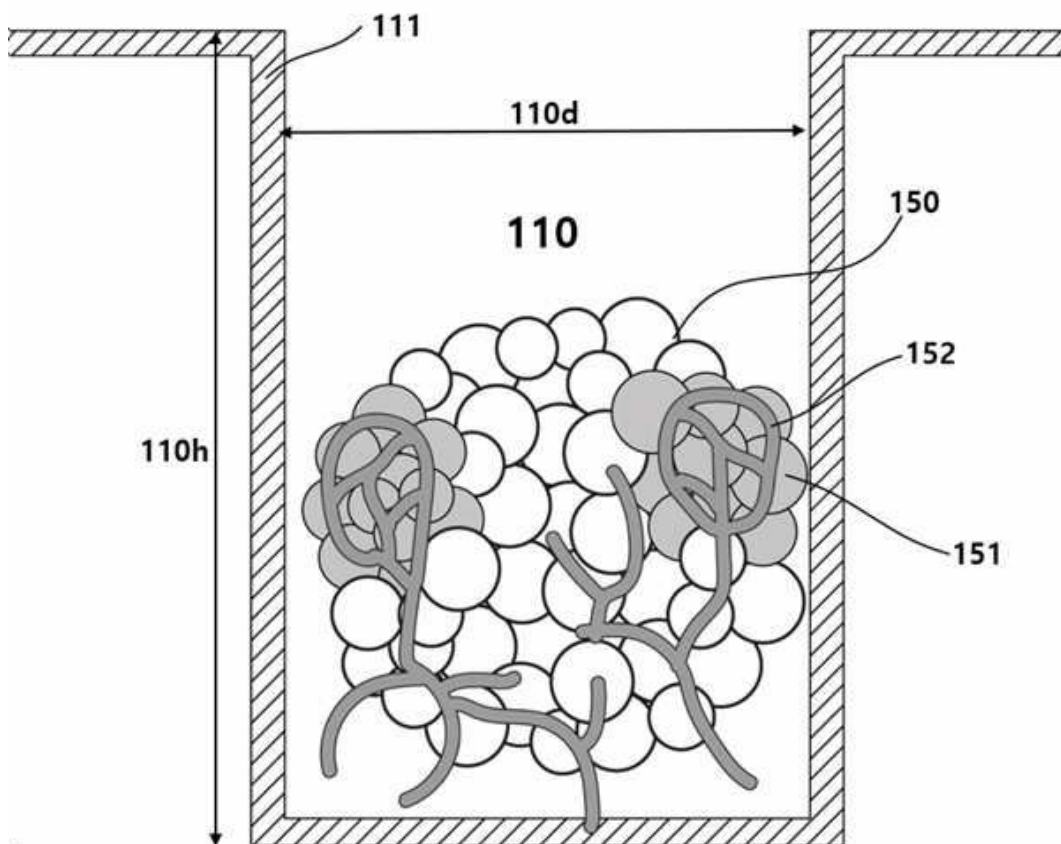
도면2

100

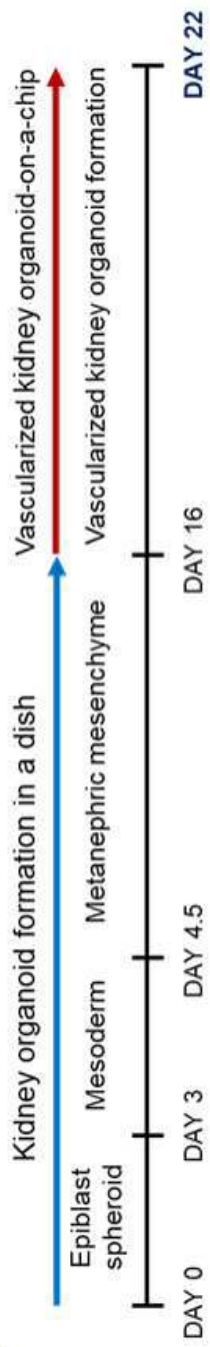


도면3

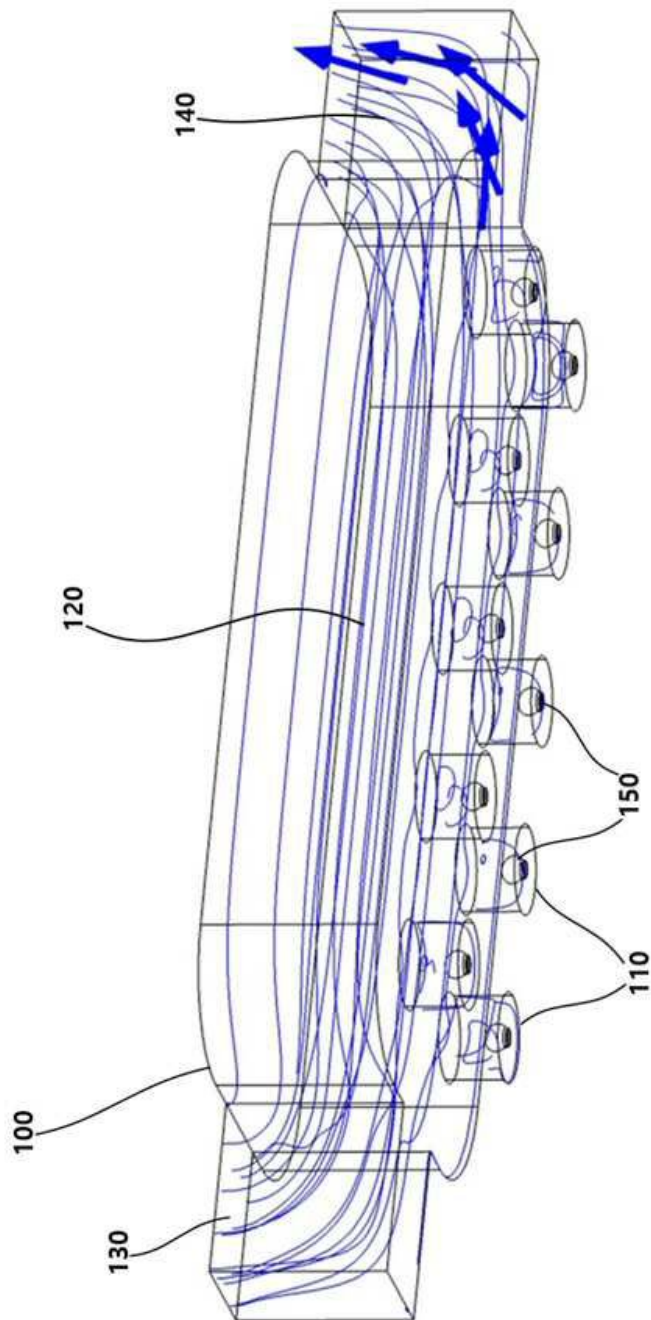
120



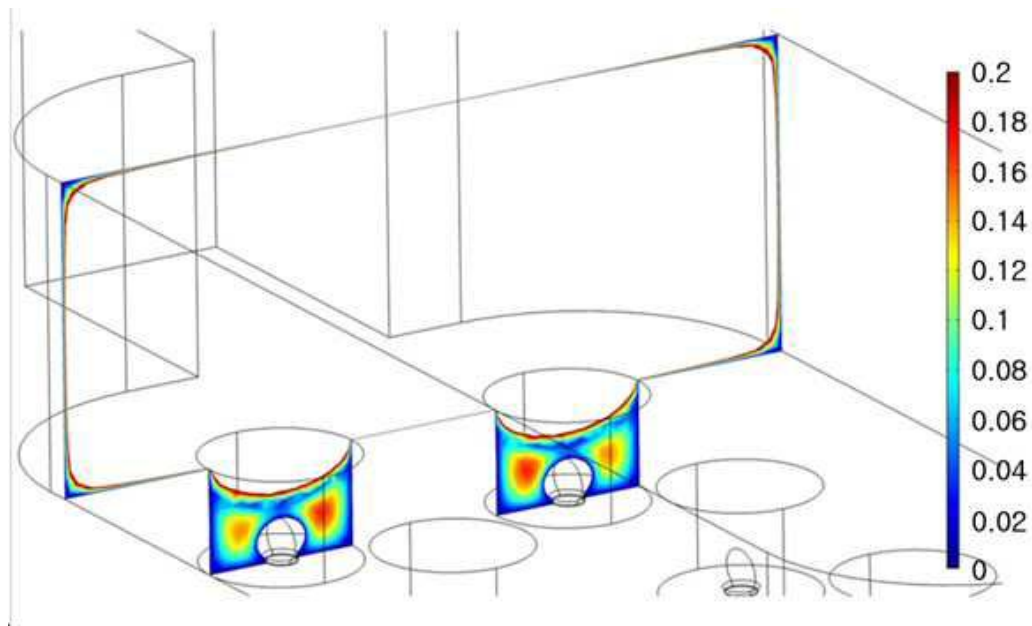
도면4



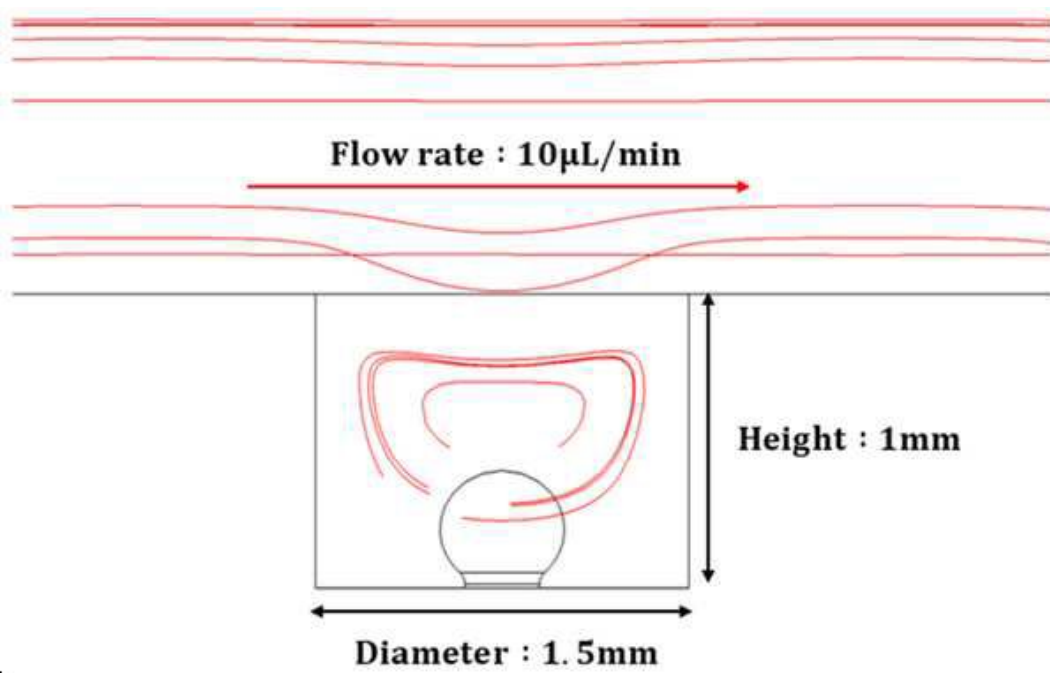
도면 5a



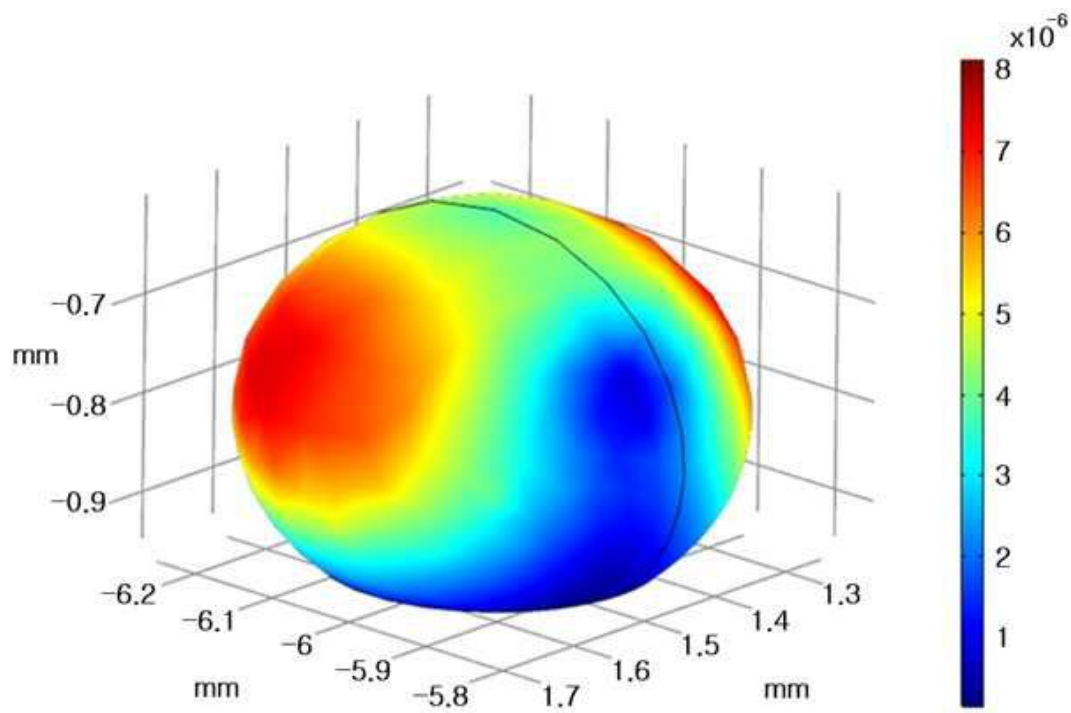
도면5b



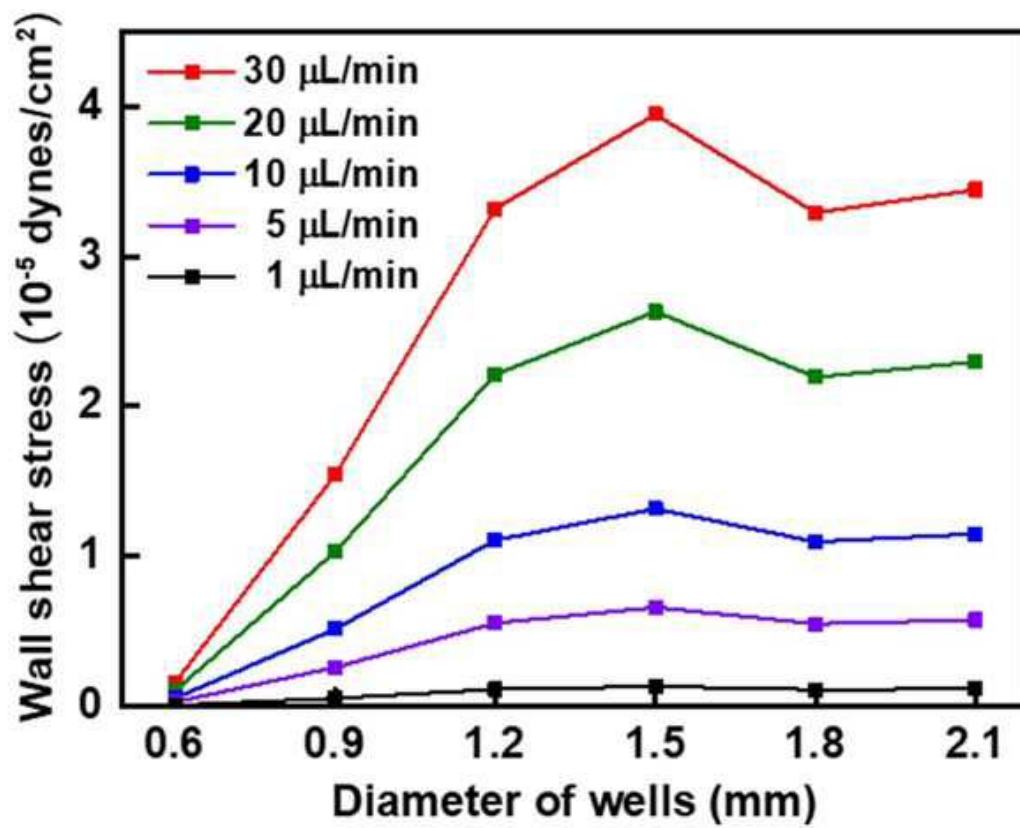
도면5c



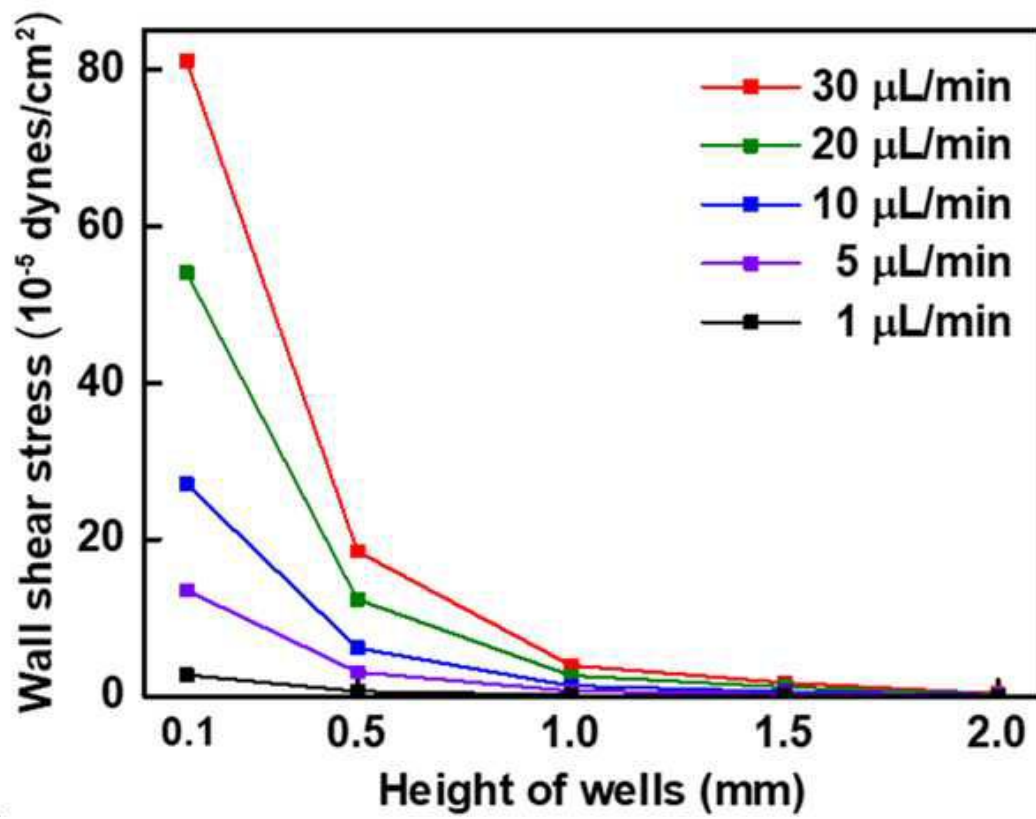
도면5d



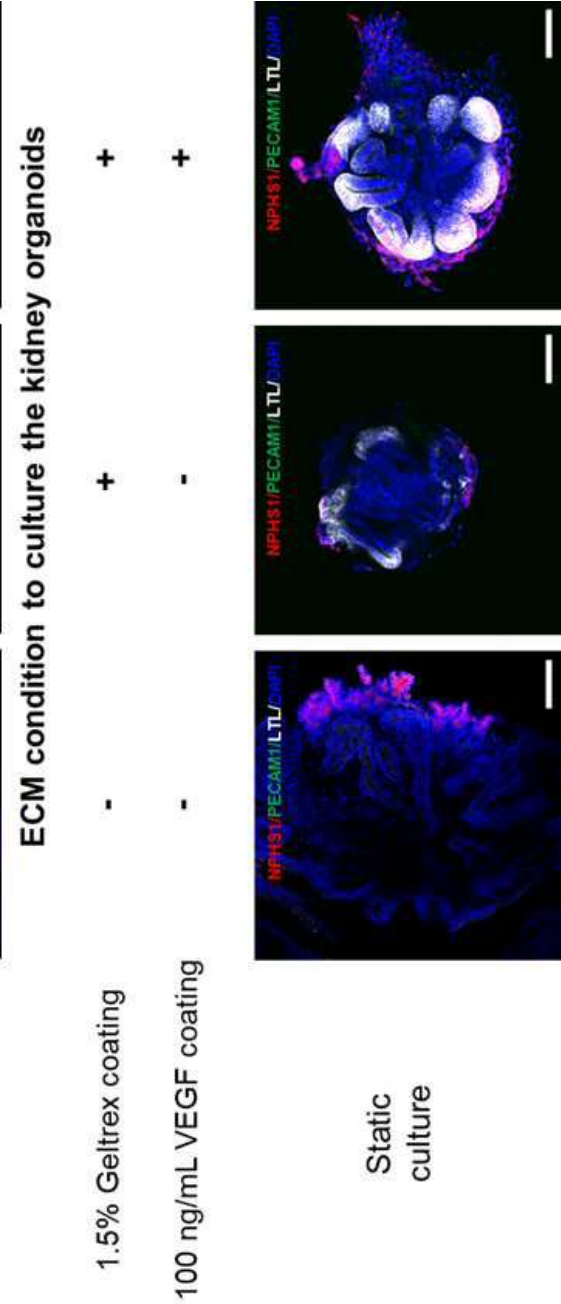
도면5e



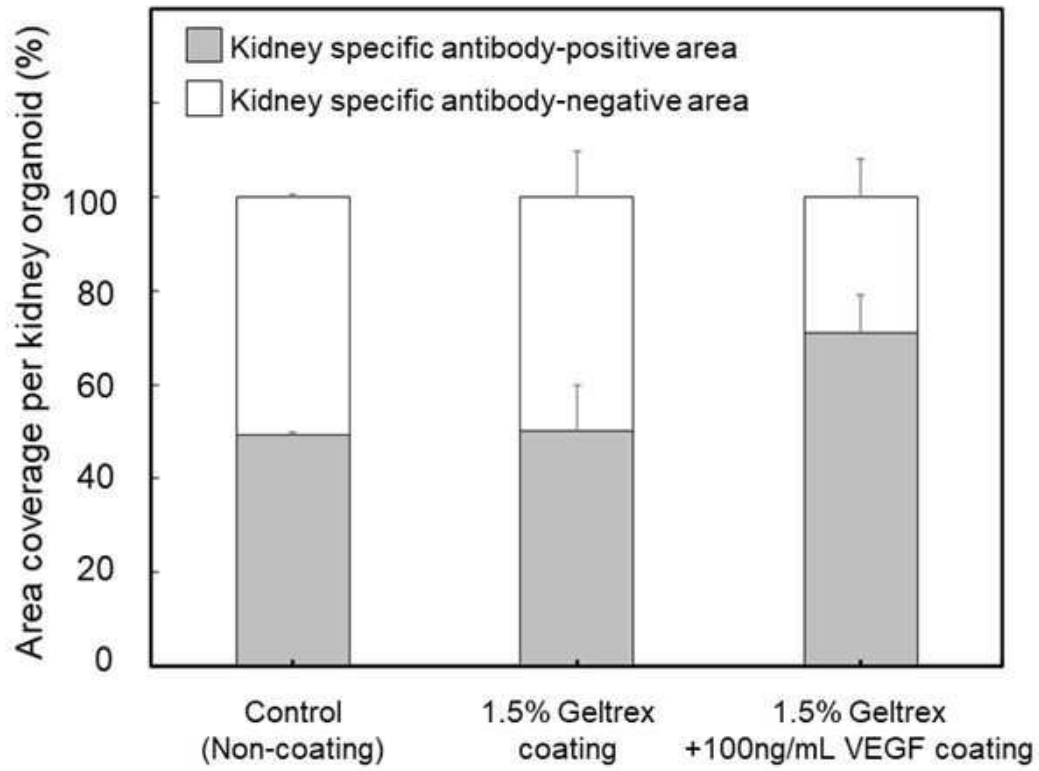
도면5f



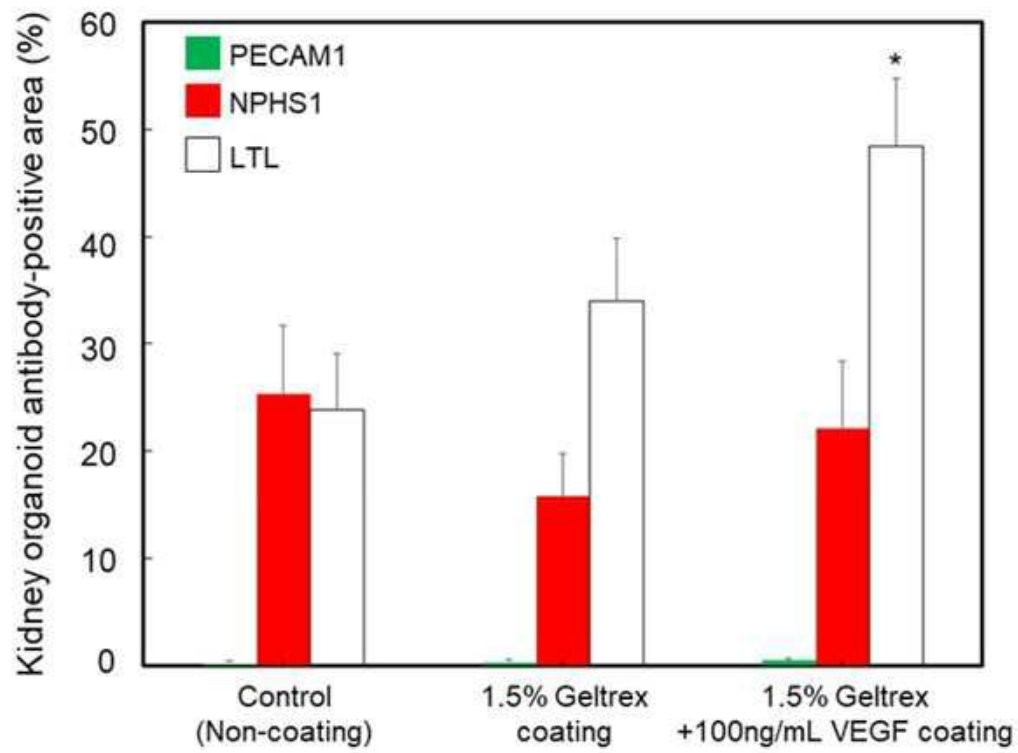
도면6a



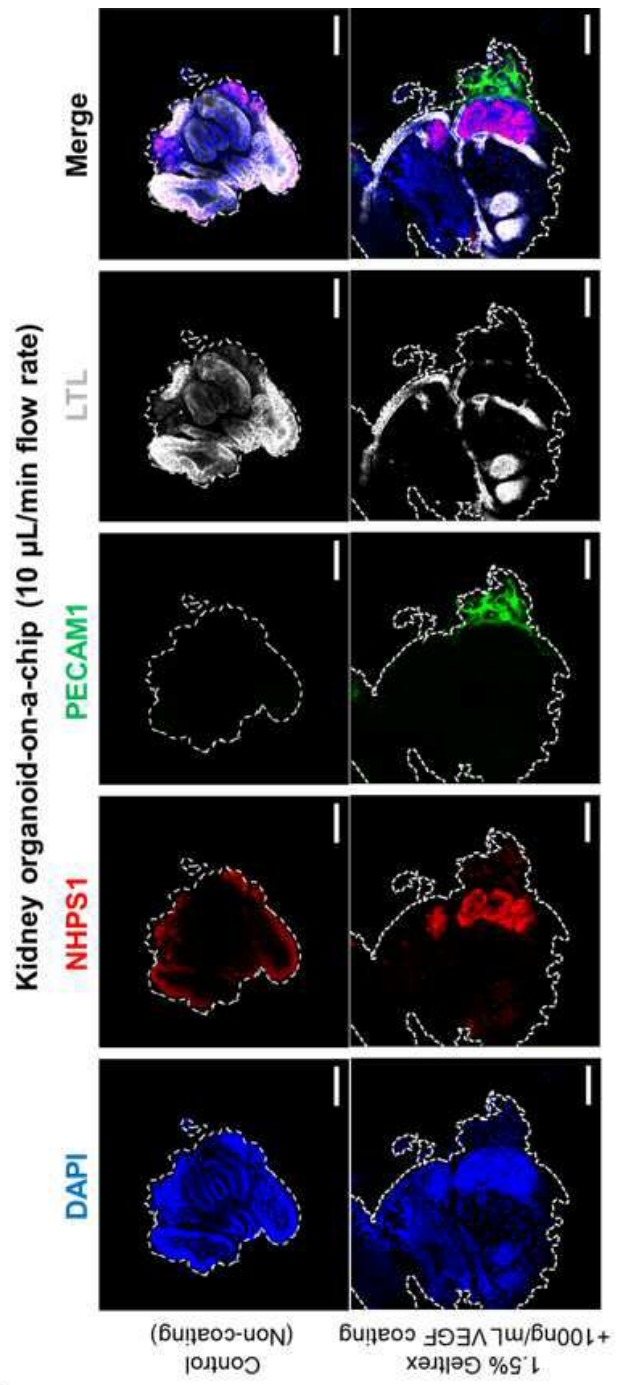
도면6b



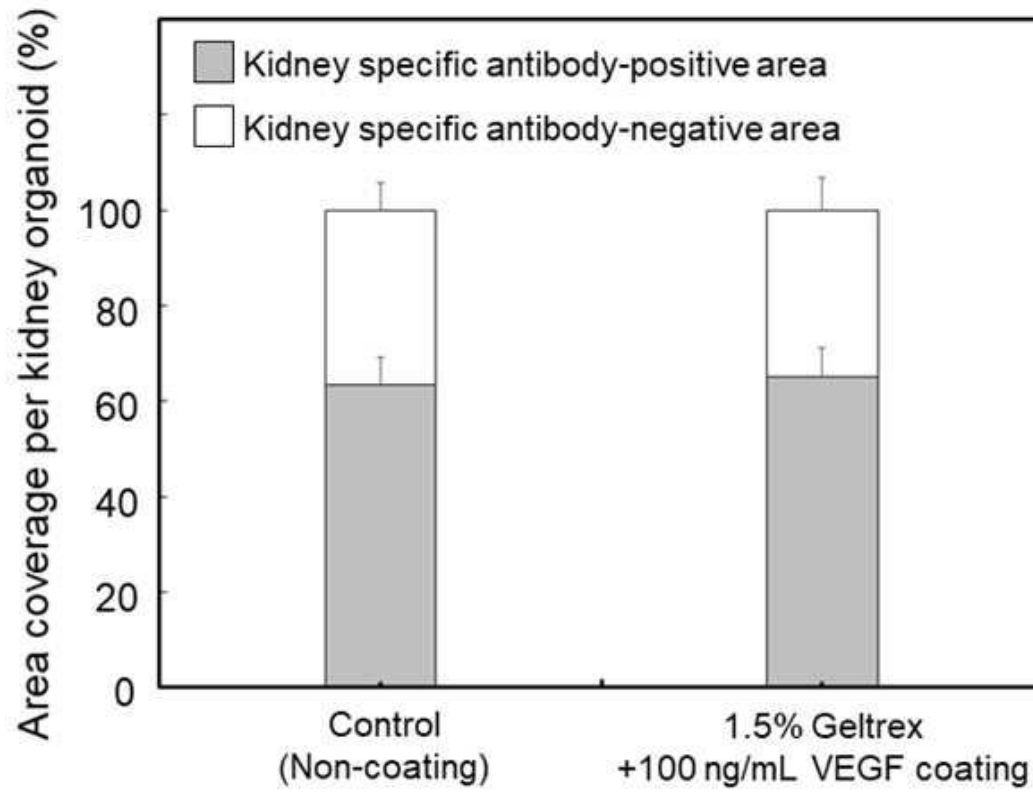
도면6c



도면7a



도면7b



도면7c

