



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월05일

(11) 등록번호 10-2692498

(24) 등록일자 2024년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/079 (2010.01)(52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 5/0618 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7034778

(22) 출원일자(국제) 2018년04월25일

심사청구일자 2021년04월14일

(85) 번역문제출일자 2019년11월25일

(65) 공개번호 10-2019-0141231

(43) 공개일자 2019년12월23일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/060559

(87) 국제공개번호 WO 2018/197544

국제공개일자 2018년11월01일

(30) 우선권주장

17168051.5 2017년04월25일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2014090993 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아이엠비에이 - 인스티튜트 퓨어 몰레쿨라레 바이오
오테크놀로지 게엠베하

오스트리아, 1030 비엔나 드라이브 불가체 3

(72) 발명자

크노브리치, 슈르겐

오스트리아, 1030 비엔나 드라이브 불가체 3 아이
엠비에이 - 인스티튜트 퓨어 몰레쿨라레 바이오
오테크놀로지 게엠베하 내

배글리, 조슈아 에이.

오스트리아, 1030 비엔나 드라이브 불가체 3 아이
엠비에이 - 인스티튜트 퓨어 몰레쿨라레 바이오
오테크놀로지 게엠베하 내

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 이중 또는 다중으로 분화된 오르가노이드

(57) 요약

본 발명은, 제1 조직을 관심 분화 단계로 발달시키는 단계; 제2 조직을 제1 조직의 관심 분화 단계와는 상이한, 관심 분화 단계로 발달시키는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장에 의한 융합을 위해 충분히 인접하게 배치하는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장시켜서 서로 융합시키는 단계; 이로써 상이한 분화 단계를 갖는 제1 조직 및 제2 조직을 포함하는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 생산하는 단계를 포함하는 2 이상의 조직 유형을 갖는 이중 또는 다중으로 분화된 조직의 생체 외 생산 방법; 상기 방법에 의해 수득된 이중 또는 다중으로 분화된 조직; 상기 조직의 용도 및 상기 방법을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 2500/99 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/41 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2533/54 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

관심 분화 단계(stage of differentiation of interest)로 발달된 제1 신경세포 조직을 제공하는 단계(step);

상기 제1 신경세포 조직의 관심 분화 단계와는 상이한, 관심 분화 단계로 발달된 제2 신경세포 조직을 제공하는 단계;

상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직을 성장에 의한 융합을 위해 충분히 인접하게 배치하는 단계;

상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직을 성장시키고 서로 융합시키는 단계; 및

상이한 분화 단계를 갖는 상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직을 포함하는, 이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직을 생산하는 단계;

를 포함하고,

2 이상의 신경세포 조직 유형을 갖는, 이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외(*in vitro*) 생산방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직 중 하나 이상은 전분화능 줄기 세포의 생체 외(*in-vitro*) 배양으로부터 유도된 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 전분화능 줄기 세포는 유도된 전분화능 줄기 세포인 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직의 관심 분화 단계로의 발달은 상기 제2 신경세포 조직의 상이한 관심 분화 단계로의 발달과 분리되는 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직 및/또는 제2 신경세포 조직의 하나 이상은 신경 전구 세포 및 신경세포를 포함하는 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직의 분화 단계는 전뇌 배쪽 전구 조직 또는 전뇌 로스트로-배쪽 조직을 포함하는 것을 특

징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 제2 신경세포 조직의 분화 단계는 전뇌 배쪽 또는 전뇌 등쪽으로 분화되지 않은 신경외배엽 또는 전뇌 등쪽 조직을 포함하는 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직을 성장에 의한 융합을 위해 충분히 인접하게 배치하는 단계 및 상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직을 성장시켜서 서로 융합시키는 단계는 현탁 배양(suspension culture)으로 수행되는 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직은 신경관 발달로 분화된 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직은 100 μm 이상의 크기로 성장된 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직은 150 μm 이상의 크기로 성장된 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직은 200 μm 이상의 크기로 성장된 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 제1 신경세포 조직 및/또는 제2 신경세포 조직은, 상기 제1 신경세포 조직 및 제2 신경세포 조직의 그룹으로부터 다른 것에 의해 발현되지 않는, 검출 가능한 표지를 발현하는 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 생체 외 생산방법.

청구항 14

상이한 분화 단계의 2 이상의 신경세포 조직 유형을 갖는 이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직으로,

상기 2 이상의 신경세포 조직 유형은 융합되어, 상기 신경세포 조직 유형 중 하나 이상은 배쪽(ventral) 신경세포 조직을 포함하고, 다른 조직 유형의 하나 이상은, 실질적으로 비-배쪽 조직이되, 상기 배쪽 신경세포 조직으로부터 이동된 세포가 상기 실질적 비-배쪽 조직 세포의 5 % 이하를 구성하도록 포함되고, 상기 이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직은 가장 긴 치수로 100 μm 내지 10 mm의 크기를 갖는 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 신경세포 조직 유형 중 적어도 하나는, 상기 이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 다른 조직 유형에 의해 발현되지 않는 검출가능한 표지를 발현하는 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

구상체 또는 조직 슬라이스 형태인 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직.

청구항 17

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직의 분화에 영향을 미치는 후보 화합물을 테스트하거나 스크리닝하는 방법으로,

제 14 항 내지 제 16 항 중의 어느 한 항의 신경세포 조직을 상기 후보 화합물과 접촉시키고, 상기 접촉된 조직의 배양을 유지하고, 상기 후보 화합물과 접촉하지 않은 상기 조직과 비교하여 조직에서의 임의의 분화적 변화를 관찰하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 따른 조직 배양을 제공하는 키트로서,

상기 키트는 배쪽 분화 유도제 및 등쪽(dorsal) 분화 유도제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 배쪽 분화 유도제로서 WNT 억제제 및/또는 SHH 증진제 및 상기 등쪽 분화 유도제로서 SHH 억제제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 20

제 15 항에 있어서,

상기 검출가능한 표지는 형광 표지인 것을 특징으로 하는,

이중 또는 다중으로 분화된 신경세포 조직.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 인공 오르가노이드(organoid) 모델 조직 분야에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 3차원(3D) 오르가노이드 배양 기술은 생체 내 발달을 연상시키는 복잡한 기관 유사 조직의 발달을 허용한다(국제 공개 WO 2014/090993; Lancaster 등, Nature 501, 373-379 (2013); Lancaster & Knoblich, Science 345, 1247125 (2014)). 중요하게, 대뇌 오르가노이드는 상이한 뇌 영역 정체성에 해당하는 다양한 세포 유형의 발생을 포함하는 배아 피질 발달의 많은 양상을 반복한다(Lancaster & Knoblich, Nat Protoc 9, 2329-2340 (2014)). 예를 들어, 대뇌 오르가노이드는 흥분성 뉴런 및 억제성 중간뉴런을 발생시키는 전뇌 등쪽 및 배쪽 전구체(progenitor)를 각각 생성할 수 있다. 또한, 대뇌 오르가노이드는 인간 환자 유래 유도된 전분화능 줄기 세포(hiPSC)로부터 발생될 수 있고, 소두증 및 자폐증과 같은 신경계 장애의 기능적 계층 연구에 사용될 수 있다.
- [0003] Maroof 등의 문헌 『Cell Stem Cell 12, 559-572 (2013)』 및 Nicholas 등의 문헌 『Cell Stem Cell 12, 573-586 (2013)』에는 마우스 체내에서 인간의 신경 발달을 모델링하는 방법이 기재되어 있다. 상기 방법은 체외 피질 배양보조세포층에서 줄기 세포를 배양한 뒤, 추가 발달을 위해 면역손상된 마우스의 신생아 신피질로 세포를 이식하는 것을 포함한다. Liu 등은 문헌 『Nat Protoc 8, 1670-1679 (2013)』에서 작은 신경구(20 μ m-50 μ m)에서 세포를 배양하고 신경구의 상기 세포를 배양 중에 GABA⁺ 신경세포로 분화시키는 것을 기재하고 있다.
- [0004] 미국 공보 US 2016/289635 A1에는 인공 중뇌 조직을 생산하는 방법이 기재되어 있다.
- [0005] 국제 공개 WO 2014/033322 A1은 전구 세포를 분화시켜 체장 내배엽을 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0006] 국제 공개 WO 2011/055855 A1은 배양된 줄기 세포에서 분화를 유도하는 방법에 관한 것이다.
- [0007] 미국 공보 US 2016/312181 A1에는 줄기 세포로부터 신경 세포의 분화가 기재되어 있다.
- [0008] 그럼에도 불구하고, 이전의 상기 모델 시스템은 어떠한 생리학적 발달도 시뮬레이션할 수 없다. 예를 들어 대뇌 피질은 2 개의 주요 뉴런 집단, 흥분성 글루타메이트성 피라미드형 뉴런 및 억제 γ -아미노부티르산(GABA) 생성 중간뉴런을 포함한다. 흥분성 피질 신경세포는 전뇌 등쪽 전구체에 의해 주로 발생되는 반면, 억제성 GABA 생성 피질의 중간뉴런은 전뇌 배쪽 전구체에 의해 발생된다. 대뇌 피질 회로로의 통합을 위해 중간뉴런은 배쪽 기원에서 표적 등쪽 피질 영역으로 장거리 이동을 수행한다. 이 장거리 접선 이동은 많은 신호 전달 경로에 의해 제어되고 일부 신경 질병 관련 유전자의 돌연변이는 중간뉴런의 이동을 방해할 수 있다. 그러나, 환자 특이적 돌연변이와 인간 뇌 발달 사이의 관계는 적절한 실험에 의한 인간 모델 시스템 없이 수수께끼로 남아있다.
- [0009] 따라서, 뇌와 매우 유사한 생체 외 대규모 배양에서 자연적인 뇌, 특히 인간 뇌의 추가적인 특징을 모델링하고 가능한 말기/광범위한 단계까지 뇌 발달을 모델링할 필요성이 있다.

발명의 내용

- [0010] 본 발명은 2 이상의 조직 유형을 갖는 이중 또는 다중으로 분화된 조직의 생산 방법에 관한 것으로, 상기 방법은, 관심 분화 단계로 발달된 제1 조직을 제공하는 단계; 제1 조직의 관심 분화 단계와는 상이한, 관심 분화 단계로 발달된 제2 조직을 제공하는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장에 의한 융합에 충분히 인접하게 위치시키는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장시켜서 서로 융합시키는 단계; 이로써 상이한 분화 단계를 갖는 상기 제1 조직 및 제2 조직을 포함하는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 생산하는 단계를 포함한다.
- [0011] 또한, 관심 분화 단계로 제1 조직을 발달시키는 단계; 제1 조직의 관심 분화 단계와는 상이한 관심 분화 단계로 제2 조직을 발달시키는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장에 의한 융합에 충분히 인접하게 위치시키는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장시켜서 서로 융합시키는 단계; 이로써 상이한 분화 단계를 갖는 상기 제1 조직 및 제2 조직을 포함하는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 생산하는 단계를 포함하는, 2 이상의 조직 유형을 갖는 이중 또는 다중으로 분화된 조직의 생산방법이 제공된다.
- [0012] 본 발명은 또한 상기 방법으로 수득 가능한 생체 외에서 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 제공한다. 특히, 상이한 분화 단계의 2 이상의 조직 유형을 갖는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 제공되되, 상기 조직 유형 중 적어도 하나는 배쪽(ventral) 신경세포 조직을 포함하고 적어도 다른 조직 유형은 실질적으로 비-배쪽(non-ventral) 조직이되 실질적으로 비-배쪽 조직 세포의 5 % 이하를 구성하는 배쪽 신경세포 조직으로부터 이동된 세포를 포함하고 상기 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 가장 긴 치수로 100 μ m 내지 10 mm의 크기를 갖는다.
- [0013] 또한 이중 또는 다중으로 분화된 조직의 발달에 영향을 미치는 후보 화합물을 테스트하는 방법으로, 본 발명의 방법에 따른 세포 또는 조직을 후보 화합물과 접촉시키거나 본 발명의 조직을 후보 화합물과 접촉시키고 상기

접촉된 조직의 배양을 유지시키고, 상기 후보 화합물과 접촉하지 않은 상기 조직과 비교하여 조직에서의 임의의 발달적 변화를 관찰하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 조직 배양을 제공하는데 적합한 키트로서, 배쪽 분화 유도제 및 등쪽 분화 유도제, 바람직하게는 배쪽 분화 유도제로서 WNT 억제제 및/또는 SHH 증진제 및 바람직하게는 등쪽 분화 유도제로서 SHH 억제제를 포함하는 키트를 제공한다. 상기 키트는 본 발명의 방법에 유용하고 이에 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 모든 구현에는 다음의 상세한 설명에서 함께 설명되며 모든 바람직한 구현에는 모든 구현에, 측면, 방법, 조직 및 키트 유사물에 관한 것이다. 예를 들어, 키트 또는 이들의 구성 요소는 본 발명의 방법에 사용되거나 이에 적합할 수 있다. 설명된 방법에 사용된 모든 구성 요소가 키트 내에 있을 수 있다. 본 발명의 조직은 본 발명의 방법의 결과물이거나 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 방법의 바람직하고 상세한 설명은 본 발명의 적합성 및 얻어진 조직에 대해 동일하게 이해된다. 달리 언급되지 않는 한, 모든 구현에는 서로 조합될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 2 이상의 조직 유형을 갖는 이중 또는 다중으로 분화된 조직의 생산방법에 관한 것으로, 상기 생산방법은, 관심 분화 단계로/에서 제1 조직을 제공하거나 발달시키는 단계; 제1 조직의 관심 분화 단계와는 상이한, 관심 분화 단계로/에서 제2 조직을 제공하거나 발달시키는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장에 의한 융합을 위해 충분히 인접하게 위치시키는 단계; 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장시켜서 서로 융합시키는 단계; 이로써 상이한 분화 단계를 갖는 상기 제1 조직 및 제2 조직을 포함하는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 생산하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 시험관에서 진행되거나 생체 외, 예컨대 바이알 또는 접시 또는 다른 세포 배양 장비 같은 컨테이너에서 보통 수행된다. 전형적으로, 상기 제1 조직 및/또는 상기 제2 조직, 특히 둘 모두 (및 선택적 추가 조직)는 생체 외, 즉 생체 외 배양으로부터 유래한다. 바람직하게는 상기 제1 조직 및/또는 상기 제2 조직, 특히 둘 모두 (및 선택적 추가 조직)는 전분화능 줄기 세포로부터 생체 외 유래, 또는 다른 말로 전분화능 줄기 세포의 생체 외 배양으로부터 유래한다. 상기 제1 조직 및/또는 상기 제2 조직, 특히 둘 모두 (및 선택적 추가 조직)는 유도된 전분화능 줄기 세포(이것은 교대로 예를 들어 환자로부터 분리된 세포로부터 유래할 수 있다)로부터 유래하거나 또는 다른 말로, 유도된 전분화능 줄기 세포의 생체 외 배양으로부터 유래하는 경우 특히 바람직하다.

[0017] 3D 배양을 포함하는 인공 조직 배양 방법은 문헌[국제 공개 WO 2014/090993, Lancaster 외, Nature 501, 373-379 (2013), Lancaster & Knoblich, Science 345, 1247125-1247125 (2014) 및 Lancaster & Knoblich, Nat Protoc 9, 2329-2340 (2014)](이들 모든 문헌이 본 명세서에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 상기 선행 방법은 본 발명의 이중 또는 다중 분화된 조직의 일부를 형성하는 상기 제1 조직 및 제2 조직 및 임의의 추가 조직을 발달시키기 위해 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 국제 출원 PCT/EP2017/050469(본 명세서에 참조로 포함됨)에는 3차원 매트릭스 지지체 상에서 오르가노이드를 생성하는 개선된 방법이 기술되어 있다. 상기 방법 역시 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 또한, 미국 특허 US 2011/0143433에는 조직으로 발달시킬 수 있는 줄기 세포 배양에 관해 기술되어 있고, 이것은 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 선행 오르가노이드는 자연적인 뇌와 유사한 특성 및 층을 갖는 인공 신경세포 조직을 생체 외에서 만드는데 성공했다.

[0018] 요약하면, 많은 조직이 개발되었다. 상기 조직들은 관심 분화의 특정 단계에서 발달된 제1 조직 및 관심 분화의 특정 단계에서 제2 (및 선택적으로 임의의 추가) 조직으로서 본 발명의 출발점으로 이용될 수 있다. 신경 또는 신경세포 조직이 특히 중요하다. 신경 조직은 복잡한 분화 패턴을 겪어서 발달 생물학에서 인간 뇌의 올바른 모델링에 어려움을 준다. 비록 진전은 있었지만(Lancaster 등 및 Lancaster & Knoblich에 의한 앞의 모든 문헌), 동물 또는 인간 뇌로 진화할 수 있는 조직의 완전한 발달을 모델링하는 것은 여전히 불가능하다(Brüstle, Nature 501 (2013): 319-320; Chambers 등 Cell Stem Cell (2013) 13: 377-378). 본 발명의 방법 및 조직이 바람직하게는 신경 조직(이들 조직에 대한 특정 유리한 효과 및 결과가 제시되었음으로)에 관한 것이지만, 임의의 종류의 조직에 대해 이점이 가능하므로, 이것은 특정 조직에 대한 본 발명의 기여의 제한으로 이해되어서는 안된다.

[0019] 제1, 제2 및 선택적 추가 조직 세포는 특정 기관 유형으로 발달할 수 있거나 또는 특정 분화 운명으로 분화를 시작했을 수도 있다. 조직 세포는 (이전의 전분화능 또는 훨씬 덜 분화된 상태에서) 다분화능이 되었을 수 있고, 일부 세포는 심지어 단분화능 또는 체성 조직 세포일 수 있다. 조직의 분화운명은 임의의 조직을 향할 수 있다. 바람직하게는, 표적 조직은 신경세포 조직, 결합 조직, 간 조직, 혈장 조직, 신장 조직, 골수 조직, 심장 조직, 망막 조직, 장 조직, 폐 조직 및 내피 조직으로부터 선택된다. 예를 들어, 조직은 조직 특이적 분화를 경

험한 상기 조직에 대한 임의의 줄기 세포를 포함할 수 있다. 바람직하게 조직은 신경세포 또는 신경형성, 지방 생성, 근형성, 힘줄생성(tenogenic), 연골발생, 골형성, 인대형성, 피부형성, 간 또는 내피 세포로부터 선택된 세포를 포함한다. 일부의 경우, 조합 예를 들어, 기관 세포(예를 들어 신경세포, 근형성, 간)와 지지 조직(예를 들어 내피, 지방 생성, 인대형성 세포)으로 발달하는 세포와의 조합도 가능하다. 상기 방법에서, 분화는 일반적으로 알려진, 분화 유도제라고도 하는, 조직 특이적 성장 또는 분화 인자에 의해 개시될 수 있다. 상기는 당업계에 예들로 공지되어 있으며, 예를 들어 국제 공개 WO 2009/023246 A2, 국제 공개 WO 2004/084950 A2 및 국제 공개 WO 2003/042405 A2에 개시되어 있다. 또한, 상기 분화 또는 성장 인자는 골 형태발생 단백질, 연골 유래 형태발생 단백질, 성장 분화인자, 혈관 신생 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈관 내피 성장 인자, 표피 성장 인자, 섬유모세포 성장 인자, 간세포 성장 인자, 인슐린 유사 성장 인자, 신경 성장 인자, 콜로니 자극 인자, 뉴로트로핀, 성장 호르몬, 인터루킨, 결합 조직 성장 인자, 부갑상선 호르몬 관련 단백질(예를 들어 국제 공개 WO 2004/084950 A2에 개시됨)일 수 있다. 이들 인자/제제는 상업적으로 이용 가능하여 추가적인 설명이 필요하지 않다. 물론, 상기 조직 유형 중 어느 하나에 대한 상기 인자/제제는 본 발명의 키트 내에 포함될 수 있다. 바람직하게는 신경세포 또는 신경형성 세포가 상기 방법에 이용되거나 키트 내에 제공되고 바람직하게는 신경 세포 또는 신경형성 세포는 본 발명의 조직 내에 존재한다.

[0020] 조직은 임의의 조직, 특히 상기 기재된 조직에 대한 전구 세포, 예컨대 줄기 세포를 포함할 수 있다. 전구 세포는 바람직하게는 전능 줄기 세포, 전분화능 줄기 세포, 다분화능 줄기 세포, 간엽성 줄기 세포, 신경세포 줄기 세포(neuronal stem cell), 조혈 줄기 세포, 체장 줄기 세포, 심장 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 배아 생식 세포, 신경 줄기 세포(neural stem cell), 특히 신경관 줄기 세포(neural crest stem cell), 신장 줄기 세포, 간 줄기 세포, 폐 줄기 세포, 혈관 모세포 및 내피 전구 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 본 발명의 방법에 사용된 전분화능 세포 또는 전구 세포는 탈분화 연골 발생 세포, 근형성 세포, 골형성 세포, 힘줄생성(tendogenic) 세포, 인대형성 세포, 지방생성 세포 또는 피부형성 세포로부터 유래할 수 있다.

[0021] 분화는 조직 특이적 성장 인자 또는 분화 인자와 세포를 접촉시켜 달성될 수 있다. 접촉 후 세포는 원하는 조직으로 발달할 수 있다. 상기 조직 특이적 성장 인자 또는 분화 인자는 신경세포 또는 신경형성, 근형성, 힘줄생성(tenogenic), 연골발생 또는 골형성 분화 인자, 특히 바람직하게는 신경세포 분화 인자일 수 있다. 상기 인자는 후기 발달에서 세포 조직의 각 유형으로의 발달을 결정할 것이다. 이로써 세포는 전분화능 세포에서 다분화능 세포로 변한다. 그 후 다른 조직 유형은 가능하지 않거나 전분화능 상태로의 복귀에 의해서만 다시 가능하다. 통상적으로 모든 세포가 선택된 세포 유형으로 분화하는 것은 아니다. 그것은 약 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상 또는 80% 이상의 세포가 선택된 조직 유형으로 분화를 개시하여 각각의 조직 운명을 갖는 다분화능 세포로 이들의 분화 가능성이 감소하도록 변형된 경우 통상적으로 충분하다(세포량의 비율로서 백분율). 물론 상기 분화 운명은 인공적인 성장 및 탈분화 자극제를 이용하여 미분화 또는 덜 분화된 상태로 복귀되지 않은 세포에만 적용된다. 분명히 체성 세포조차 전분화능 세포로 복귀될 수 있고 이는 본 명세서에서 분화 상태를 정의하는 경우에는 의미되지 않는다. 바람직하게는, 세포를 전분화능 세포로 복귀시키는 어떤 인자도 세포로 도입되지 않는다.

[0022] 본 발명의 제1 조직, 제2 조직 및 선택적 추가 조직은 상이한 발달 단계 또는 분화 단계를 갖는다. 상기 상이한 분화는 상기 조직이 상이한 조직 유형, 아형 또는 다른 상이한 기관 영역 또는 기관 구성 부분, 예컨대 배쪽 및 등쪽 발달 및/또는 상이한 뇌 부분의 발달 및/또는 왼쪽 및 오른쪽 뇌 반구의 발달로 적어도 분화가 개시되었음을 의미한다.

[0023] 다음에 상기 제1 조직, 제2 조직 및 선택적 추가 조직은 부근에 위치되어 같이 성장하거나 또는 융합이 허용된다. 이것은 놀랍게도 방금 조합되거나 융합된 조직(이중 또는 다중으로 분화된 조직으로도 지칭되는)의 발달에서 현저한 새로운 관찰로 이어졌다. 예를 들어, 전뇌의 발달은 배쪽 영역에서 등쪽 영역으로 장거리에 걸친 GABA 생성 중간뉴런의 이동을 포함한다. 중간뉴런 이동에서의 결합이 신경 정신 질환 예컨대 간질, 자폐증 및 조현병의 원인인이 시사되지만, 인간에서 이러한 과정을 연구하기 위한 모델 시스템은 여전히 부족하다. 독립적으로 패턴화된 오르가노이드를 단일 조직으로 성공적으로 결합하기 위한 오르가노이드 공배양 “융합(fusion)” 패러다임이 개발되었다. 본 발명의 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 종래 오르가노이드 모델의 이점을 달성할 뿐만 아니라 그 위에 조직 유형간 세포 이동, 예컨대 인간의 중간뉴런 이동에 대한 모델을 제공하기에 적합하다. 대뇌 오르가노이드의 경우, 전뇌 등쪽 및 배쪽을 향해 특정된 오르가노이드를 융합함으로써 연속적인 등-배 축(contiguous dorsal-ventral axis)이 보여졌다. 형광 리포터를 이용하여 전뇌 배쪽에서 전뇌 등쪽으로의 방향성 GABA 생성 중간뉴런 이동을 모니터링할 수 있다. 이들 세포의 분자 분류학 및 이동 역학은 대뇌 피질 중간뉴런의 것과 유사하다. 인간 중간뉴런 이동의 시간 경과 영상화가 가능하다. 또한, 예를 들어 CXCR4 길항제

AMD3100에 의한 상기 이동의 억제가 관찰가능하다. 상기 결과는 대뇌 오르가노이드 융합 배양이 상이한 대뇌 영역간 복잡한 상호 작용을 모델링할 수 있음을 실증한다. 재프로그래밍 기술과 결합된 융합은 신경 정신 질환 환자의 세포를 이용하여 복잡한 신경발달 결함을 분석할 가능성과 잠재적인 치료적 화합물을 시험할 가능성을 제공한다.

[0024] 세포 공배양은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 줄기 세포는 부가적인 지지 또는 발달 인자를 줄기 세포에 제공하기 위해 다른 세포와의 혼합물로 배양된다(Paschos 등, Tissue Eng Regen Med (2014) DOI: 10.1002/term.1870). 본 발명은 상이한 종류의 공배양에 관한 것이다. 본 발명은 조직 수준에서의 공배양을 제공하고, 2 이상의 상이하게 발달된 조직을 함께 배양하여 융합 조직, 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 형성한다. 본래의 상이한 조직은 이중 또는 다중으로 분화된 조직 내에 별개의 조직 유형 영역에 남아있기 때문에, 상이한 본래 조직의 개별 세포들은 숙련가에 의해 혼합되지 않는다. 그러나, 당연히 세포 이동은 허용된다. 사실 상 한 조직에서 다른 조직으로 세포의 자연스런 이동이 바람직하고 융합된 조직의 자연스런 발달을 보여준다. 일부 세포는 상이한 조직 유형 사이에 연결을 형성한다.

[0025] 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 형성하는 조직의 성장은 조직 배양에 관해 당업계에 공지된 바와 같이 수행될 수 있다. 3차원 매트릭스에서 배양하는 것이 바람직하다. 3차원 매트릭스는 2D 배양, 예컨대 접시 내 평평한 표면에서의 2D 배양과는 구별된다. “3차원 배양(three dimensional culture)”은 한쪽만의 벽(예컨대 접시의 바닥 판)에 의해 막히지 않고 모든 3차원으로 확장될 수 있는 배양을 의미한다. 상기 배양은 바람직하게는 현탁 상태이다. 3차원 매트릭스는 겔, 특히 단단한 안정적인 겔일 수 있고, 이로 인해 성장하는 세포 배양/조직 및 분화의 추가 확장이 발생한다. 적합한 3차원 매트릭스는 콜라겐을 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는 3차원 매트릭스는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM) 또는 콜라겐, 라미닌, 엔탁틴 및 헤파린 황산염(heparin-sulfated) 프로테오글리칸 또는 이들의 조합으로부터 선택된 이들의 임의의 성분을 포함한다. 세포외 기질은 엔젤브레스-홀름-스웜(Engelbreth-Holm-Swarm) 종양 또는 라미닌, 콜라겐, 바람직하게는 유형 4 콜라겐, 엔탁틴 및 선택적으로 추가 헤파린 황산염 프로테오글리칸 또는 이들의 임의의 조합과 같은 이들의 임의의 성분으로부터 유래할 수 있다. 그러한 기질은 매트릭셀(Matrigel)이다. 매트릭셀은 당업계에 공지되어 있고(미국 특허 US 4,829,000) 이전에 3D 심장 조직(국제 공개 WO 01/55297 A2) 또는 신경세포 조직(국제 공개 WO 2014/090993)을 모델링하는데 사용되었다. 바람직하게는 매트릭스는 라미닌, 콜라겐 및 엔탁틴, 바람직하게는 농도가 30%-85% 라미닌, 3%-50% 콜라겐 및 매트릭스가 겔을 형성하기에 충분한 엔탁틴, 통상적으로 0.5%-10% 엔탁틴을 포함한다. 라미닌은 콜라겐 양이 겔을 형성하기에 불충분하다면 겔을 형성하기 위해 엔탁틴의 존재를 요구할 수 있다. 훨씬 더 바람직하게는, 매트릭스는 약 50%-85% 라미닌, 5%-40% 콜라겐 IV, 선택적으로 1%-10% 니도젠(nidogen), 선택적으로 1%-10% 헤파린 황산염 프로테오글리칸 및 1%-10% 엔탁틴을 중량부로 함유하는 3.7 mg/ml 이상의 농도를 포함한다. 매트릭셀의 고형 성분은 통상적으로 대략 60% 라미닌, 30% 콜라겐 IV 및 8% 엔탁틴을 포함한다. 매트릭스 성분에 대해 주어지는 모든 백분율(% 값)은 중량(wt. %)이다. 엔탁틴은 라미닌 및 콜라겐과 상호작용하는 가교 분자이다. 상기 매트릭스 성분은 단계 r)에서 추가될 수 있다. 이들 성분은 또한 본 발명의 키트의 바람직한 일부분이다. 3차원 매트릭스는 성장 인자, 예컨대 EGF(표피 성장 인자), FGF(섬유모세포 성장 인자), NGF, PDGF, IGF(인슐린 유사 성장 인자), 특히 IGF-1, TGF- β , 조직 플라스미노젠(plasminogen) 활성제 중 어느 하나를 추가로 포함할 수 있다. 3차원 매트릭스는 또한 이들 성장 인자 중 어느 것도 없을 수 있다.

[0026] 일반적으로, 3차원 매트릭스는 생체에 적합한 매트릭스의 3차원 구조이다. 바람직하게는 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 히알루로난(hyaluronan), 메틸셀룰로오스, 라미닌 및/또는 알기네이트(alginate)를 포함한다. 매트릭스는 겔 특히 하이드로겔일 수 있다. 유기화학적 하이드로겔은 다가 친수성 그룹을 갖는 폴리비닐 알콜, 나트륨 폴리 아크릴레이트, 아크릴레이트 중합체 및 공중합체를 포함할 수 있다. 하이드로겔은 친수성이고, 때때로 물이 분산매인 콜로이드 겔로서 발견되는 중합체 사슬의 네트워크를 포함한다. 하이드로겔은 고흡습성(99 중량% 이상의 물을 함유할 수 있음) 천연 또는 합성 중합체이다. 하이드로겔은 또한 상당한 수분 함량 때문에 천연 조직과 매우 유사한 정도의 유연성을 가지고 있다. 3차원 매트릭스 또는 그 성분, 특히 ECM 또는 콜라겐은 생산된 조직 배양에 여전히 남아있는 것이 가능하다. 바람직하게는 3차원 매트릭스는 콜라겐 매트릭스이고, 바람직하게는 유형 I 및/또는 유형 IV 콜라겐을 함유한다.

[0027] 융합을 위한 출발 물질로서 사용되는 제1 조직, 제2 조직 및 선택적 추가 조직은 또한 상기 기재된 바와 같은 3차원 매트릭스에서 성장 또는 분화될 수 있고 당연히 적합한 성장 요소가 상기 기재된 바와 같이 원하는 조직 유형으로의 분화를 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 세포, 바람직하게는 줄기 세포를 3차원 매트릭스에서 성장시키는 단계 및 본 발명의 방법에서 추가로 사용될 예정인 제1 조직 및/또는 제2 조직 및/또는 추

가 조직으로 세포를 분화시키는 단계를 제공한다. 본 발명은 또한 3차원 매트릭스에서 성장된 조직을 이용하는 것을 제공한다.

[0028] 바람직하게는, 관심 분화 단계로 제1 조직을 발달시키는 것은 상이한 관심 분화 단계로 제2 조직을 발달시키는 것과 별개이다. 제1 조직 및 제2 조직 (및 사용되는 경우 추가 조직 역시)의 분화를 분리하면 분화를 보다 잘 통제할 수 있다. 당연히 예를 들어 등쪽 또는 배쪽 조직처럼 특정 조직의 아형을 향한 별개의 분화를 갖는, 상기 언급된 바와 같은 일반적인 신경세포 조직 또는 임의의 다른 기관 또는 조직 부류와 같은 일반적인 기관 운명을 향한, 특정 단계까지 적어도 공분화가 또한 가능하다. 별개의 분화는 예를 들어 별개의 컨테이너, 예를 들어 상이한 바이알, 플라스크 또는 접시에서 될 수 있다.

[0029] 특히, 제1 조직 및/또는 제2 조직을 포함하는 인공 조직 배양물이 제공된다. 상기 배양은 세포 또는 세포의 집합체로부터 생체 외에서 성장된 것일 수 있다. 상기 배양은 특히 생체 내에서 발달된 뇌 또는 그것의 조직 샘플을 배양한 것이 아니다. 본 발명을 생성하기 위한 출발 블록으로서 사용되는 제1 조직 및 제2 조직은 바람직하게는 분리 가능, 즉 이미 함께 자란 것이 아니다. 이들은 자르거나 찢는 것과 같은 세포 결합 또는 ECM(세포외기질) 결합을 끊지 않고 분리될 수 있다.

[0030] 다음으로 제1 조직 및 제2 조직은 성장에 의한 융합이 허용되는 부근에 위치된다. 상기 조직은 직접적으로 인접하거나, 성장에 의해 조직의 연결이 허용되는 중간에 거의 공간이 없게 (예를 들어 매트릭스 물질, 예를 들어 상기 언급된 3차원 매트릭스 물질로 채워져서) 위치될 수 있다. 상기 거리는 0.001 μm 내지 50 μm , 바람직하게는 0.01 μm 내지 20 μm 또는 0.1 μm 내지 10 μm 또는 1 μm 까지일 수 있다. 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장에 의한 융합을 위해 충분한 근방에 위치시키고 상기 제1 조직 및 제2 조직을 성장시켜서 서로 융합시키는 단계는 바람직하게는 현탁 배양(suspension culture)으로, 예를 들어 적절한 배양 배지 또는 매트릭스, 예컨대 하이드로겔과 같은 3D 매트릭스에 배치한 후에 수행된다.

[0031] 연결되는 동안 그리고 또한 그 후에, 상기 조직은 바람직하게는 3차원 매트릭스에서 배양된다. 따라서, 상기 제1 및 제2 (및 선택적 추가) 조직은 상기에 기재된 바와 같은 3차원 매트릭스 물질, 바람직하게는 하이드로겔 안쪽에 위치된다. 이어서, 상기 조직은 계속 자라고 융합하여 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 형성할 것이다. 상기 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 추가 발달을 위해 하이드로겔과 같은 3차원 매트릭스에서 계속 성장하거나 유지될 수 있다. 상기 추가 발달은 하나의 조직 유형에서 다른 조직 유형으로 세포의 이동이 허용되는 것을 포함할 수 있다. 상기 조직 유형은 원래 별개의 제1 조직 및 제2 조직 (및 존재하는 경우 선택적 추가 조직)에 의해 생겨난 조직이다. 따라서 바람직하게는 본 발명은 상기 이중 또는 다중으로 분화된 조직 내에 제1 조직에서 제2 조직으로 이동하는 세포를 포함한다.

[0032] 바람직하게는 조직은 심지어 연결(융합) 후에도 추가 배양된다. 연결 후에 조직 유형 간의 세포 이동과 같은 흥미로운 과정이 관찰될 수 있다. 추가 발달이 일어날 수 있다. 바람직하게는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 연결 후 5 일 이상, 바람직하게는 연결 후 10 일 이상 동안 배양된다.

[0033] 본 발명의 바람직한 구현예에서 조직은 신경세포 조직이고, 특히, 본 발명의 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 대뇌 오르가노이드이다. 대뇌 오르가노이드는 예를 들어 국제 공개 WO 2014/090993, 국제 출원 PCT/EP2017/050469, Lancaster 등의 문헌 『Lancaster & Knoblich』, 또는 이들 문헌 모두에 개시되어 있다. 오르가노이드는 사실적인 미세-해부학적 구조를 보여주는 3차원으로 생체 외에서 생산된 기관의 소형화되고 단순화된 버전이다. 이들은 조직, 배아 줄기 세포 또는 유도된 전분화능 줄기 세포의 하나 또는 몇 개의 세포로부터 유래하며, 이들은 자기 재생 및 분화 능력 때문에 3차원 배양에서 스스로 구조화할 수 있다. 제1, 제2 및 선택적 추가 조직은 이미 오르가노이드일 수 있고 또는 대응하는 성장 또는 분화 인자 자극제가 주어질 경우, 오르가노이드로 발달할 수 있다. 바람직하게는 적어도 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 오르가노이드로 성장되며, 이는 그 후에는 이중 또는 다중으로 분화된 오르가노이드이다.

[0034] 바람직하게는, 적어도 제1 조직은 신경세포 조직을 포함하고, 바람직하게는 외부 방사형 신경교, 피질 뇌실하대 및 피질 내부 섬유층을 (및/또는 신경 전구 세포 및 신경세포를 포함해서) 포함한다. 택일적으로 또는 추가로, 특히 추가적으로 적어도 제2 조직은 신경세포 조직을 포함하고, 바람직하게는 외부 방사형 신경교, 피질 뇌실하대 및 피질 내부 섬유층을 (및/또는 신경 전구 세포 및 신경세포를 포함해서) 포함하는 것이 바람직하다. 이들 영역, 구역 및 층은 후기의 발달된 대뇌 오르가노이드의 특징이며 바람직하게는 후기 신경 발달을 연구하기 위해 존재한다. 바람직하게는, 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 신경세포 조직을 포함하고, 바람직하게는 외부 방사형 신경교, 피질 뇌실하대 및 피질 내부 섬유층을 (및/또는 신경 전구 세포 및 신경세포를 포함해서) 포함한다.

- [0035] 바람직하게는, 제1 조직의 분화 단계는 전뇌 배쪽 전구 조직 또는 전뇌 로스트로-배쪽 조직을 포함한다. 배쪽 또는 배쪽 유사 조직 유형으로의 상기 분화는 WNT 억제 및/또는 SHH 신호전달 증진으로 개시될 수 있다. 제1 조직 세포를 처리하는데 이용될 수 있는 적합한 WNT 억제제는 IWP2(“WNT 생성 억제제-2”, 예를 들어 CAS-no: 686770-61-6)이다. 제1 조직 세포를 처리하는데 이용될 수 있는 적합한 SHH 신호전달 증진제는 SAG(“평활화 작용제”, 예를 들어 CAS-no: 364590-63-6)이다. 실시예에 기재된 바와 같은 농도가 사용될 수 있다. WNT-억제 및/또는 SHH 신호전달 증진은 바람직하게는 신경 유도, 즉 신경 조직 발달을 향한 전구 세포의 분화와 동시에 일어난다. 바람직하게는 유사하게, 제2 조직의 분화 단계는 전뇌 배쪽 또는 전뇌 등쪽으로 분화되지 않은 신경외배엽 또는 전뇌 등쪽 조직을 포함한다. 등쪽 또는 등쪽 유사 조직 유형으로의 분화는 SHH 활성 억제로 개시될 수 있다. 제2 조직 세포를 처리하는데 이용될 수 있는 적합한 SHH 활성 억제제는 사이클로파민 A(CycA)이다. 실시예에 기재된 바와 같은 농도가 사용될 수 있다. SHH 억제는 바람직하게는 신경 유도, 즉 신경 조직 발달을 향한 전구 세포의 분화와 동시에 발생한다. 바람직하게는, 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 일 조직 영역에서 전뇌 배쪽 전구 조직 또는 전뇌 로스트로-배쪽 조직(제1 조직에 해당) 및 다른 영역에서 전뇌 배쪽 또는 전뇌 등쪽으로 분화되지 않은 신경외배엽 또는 전뇌 등쪽 조직(제2 조직에 해당)을 포함한다. 간단히, 배쪽 및 등쪽 조직은 후기 신경 발달, 예컨대 신경 세포의 이동, 특히 중간뉴런을 형성하는 세포들과 같은 GABA 생성 신경세포의 관찰을 가능하게 한다. 상기 세포들은 배쪽 영역 밖으로 이동할 수 있고, 따라서 이것은 바람직하게는 본 발명의 제1 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직 내에 존재한다.
- [0036] 바람직하게는, 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 분화되어 신경관 또는 추가로 신경관으로 발달한다. 신경관 또는 신경관은 본 발명의 이중 또는 다중으로 분화된 조직 내에 존재할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 제1 조직은 100 μm 이상, 바람직하게는 150 μm 이상, 특히 바람직하게는 200 μm 이상의 크기로 성장할 수 있다. 유사하게 바람직하게는, 제2 조직은 100 μm 이상, 바람직하게는 150 μm 이상, 특히 바람직하게는 200 μm 이상의 크기로 성장할 수 있다. 바람직하게는 제1 조직 및 제2 조직의 크기는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 형성하기 위해 융합이 허용되기 전과 대략 동일한 크기로 성장된다. 대략 동일한 크기는 부피가 최대 40%, 바람직하게는 최대 30%, 최대 20% 또는 최대 10% 만큼 다르다는 것을 의미한다. “크기(Size)”는 3D 공간에서 가장 긴 치수를 지칭한다. 바람직하게는 상기 조직은 특히 가장 짧은 치수가 가장 긴 치수의 20% 이상, 특히 가장 긴 치수의 30% 이상 또는 40% 이상인 구형 형태이다. 바람직하게는 제1 조직 및/또는 제2 조직의 부피는 $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 이상, 특히 바람직하게는 $2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 이상, $4 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 이상, $6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 이상이다. 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 동일한 크기, 형태 및 부피 또는 훨씬 더 큰 크기 및 부피, 예컨대 $8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 이상, $10 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 이상, $15 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 이상의 부피 및/또는 250 μm 이상, 특히 바람직하게는 350 μm 이상의 크기를 가질 수 있다.
- [0038] 제1 조직 및 제2 조직은 통상적으로 세포의 작은 집합체이고, 예를 들어 최대 8 mm^3 , 최대 2 mm^3 또는 최대 1 mm^3 의 부피를 가지면서, 최대 2 mm, 바람직하게는 최대 1250 μm 또는 최대 800 μm 의 크기를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 예를 들어 최대 60 mm^3 , 최대 30 mm^3 또는 최대 10 mm^3 의 부피를 가지면서, 최대 15 mm, 바람직하게는 최대 10 mm 또는 최대 5 mm의 크기로 보다 클 수 있다.
- [0039] 제1 조직 및 제2 조직은 특정 분화의 신호로서 특정 분화 발현 표지를 발현할 수 있고 또는 그런 발현 표지의 발현이 없을 수 있다. 발현 표지는 이들 2 조직의 상이한 분화의 징후이다.
- [0040] 바람직하게는 본 발명의 제1 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 DLX2를 발현하는 세포를 포함한다. DLX2는 전뇌 배쪽 정체성 세포에서 발현된다. 바람직하게는 상기 조직 유형은 본 발명의 조직에 포함되어 있다.
- [0041] 바람직하게는 본 발명의 제1 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 GSX2를 발현하는 세포를 포함한다. GSX2는 등쪽-외측 신경절 용기 및 꼬리쪽 신경절 용기 정체성 세포에서 발현된다. 바람직하게는 상기 조직 유형은 본 발명의 조직에 포함되어 있다.
- [0042] 바람직하게는 본 발명의 제1 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 NKX2-1를 발현하는 세포를 포함한다. NKX2-1는 배쪽-내측 신경절 용기 정체성 세포에서 발현된다. 바람직하게는 상기 조직 유형은 본 발명의 조직에 포함되어 있다.
- [0043] 바람직하게는 본 발명의 제1 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 LHX6를 발현하는 세포를

포함한다. LHX6은 배쪽-내측 신경절 융기의 하부 영역 정체성 세포에서 발현된다. 바람직하게는 상기 조직 유형은 본 발명의 조직에 포함되어 있다.

- [0044] 바람직하게는 본 발명의 제1 조직, 제2 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 FoxG1을 발현하는 세포를 포함한다. FoxG1은 등쪽 피질 정체성 세포에서 발현된다. 바람직하게는 상기 조직 유형은 본 발명의 조직에 포함되어 있다.
- [0045] 바람직하게는 본 발명의 제2 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 TBR1을 발현하는 세포를 포함한다. TBR1은 전뇌 등쪽 정체성 세포에서 발현된다. 바람직하게는 상기 조직 유형은 본 발명의 조직에 포함되어 있다.
- [0046] 바람직하게는 본 발명의 제2 조직 및/또는 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 TBR2를 발현하는 세포를 포함한다. TBR2는 등쪽 피질 정체성 세포에서 발현된다. 바람직하게는 상기 조직 유형은 본 발명의 조직에 포함되어 있다.
- [0047] 본 발명의 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 제1 조직 및 제2 조직을 발생시켰던 상기 조직을 연상시키는 상기 조직 유형 사이에 융합 영역을 포함할 수 있다. 상기 융합 영역은 상기 조직 유형의 영역이 병치되게 하여 한쪽은 제1 조직 유형이고, 다른 쪽은 제2 조직 유형인 연속된 조직을 생성할 수 있다.
- [0048] 바람직하게는, 제1 조직 및/또는 제2 조직은 상기 제1 조직 및 제2 조직의 그룹으로부터 다른 것에 의해 발현되지 않는 검출가능한 표지를 발현한다. 바람직한 구현예에서 추가 조직이 존재하는 경우 동일하게 적용된다. 상기 검출가능한 표지와 상기 단락의 발현 표지를 혼동해서는 안된다. 여기서 검출가능한 표지는 재조합 발현에 대한 것과 같이 제1 조직 및/또는 제2 조직의 라벨로서 상기 조직 세포로 도입되는 라벨을 지칭한다. 형광 표지의 경우에서와 같이 쉬운 검출과 측정을 강조한다. 바람직하게는 상기 검출가능한 표지는 색 또는 형광과 같은 광학 신호를 제공한다. 상기 검출가능한 표지는 이중 또는 다중으로 분화된 조직 도처에 제1 조직 또는 제2 조직 기원(조직 유형)의 세포를 추적하기 위해 이용될 수 있다. 설명된 바와 같이, 세포는 조직 유형 사이를 이동하고 움직일 수 있다.
- [0049] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 얻을 수 있는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 제공한다. 본 발명의 방법에 따라 생체 외에서 수행되는 경우, 그 후에 상기 조직은 또한 생체 외에서 제공된다. 택일적으로, 그것은 설치류와 같은 인간이 아닌 동물로 이식될 수 있다.
- [0050] 본 발명은 상이한 분화 단계의 2 이상의 조직 유형을 갖는 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 제공하고, 상기 조직 유형 중 적어도 하나는 배쪽 신경세포 조직을 포함하고 적어도 다른 조직 유형은 실질적으로 비-배쪽 조직 이되, 실질적으로 비-배쪽 조직 세포의 5% 이하를 구성하는 배쪽 신경세포 조직으로부터 이동한 세포를 포함한다. 또한 상기 조직은 생체 외에서 제공될 수 있거나 설치류와 같은 인간이 아닌 동물로 이식될 수 있다. 생체 외(In vitro)는 상기에 언급된 바와 동일한 의미이고, 바람직하게는 상기 조직은 바이알과 같은 컨테이너 내에서 제공된다. 그것은 현탁액 또는 현탁가능한, 즉 컨테이너의 벽에 고정되지 않은 상태로 제공될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조직은 상이한 분화 단계로 발달된 조직을 사용함에 따라 상이한 조직의 융합 산물이므로, 본 발명의 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 상기 상이한 조직 융합을 반영하고 포함할 것이다. 바람직하게는 상기 언급된 바와 같이 임의의 발달 단계, 예를 들어 배쪽 또는 등쪽 발달된 조직이다. 다른 구현예는 건강한 발달 단계와 예컨대 상기 언급된 바와 같은 간질, 자폐증 및 조현병과 같은 신경 정신 질환으로부터 선택된 질병에 걸린 발달 단계의 융합을 제공한다. 또한, 2 개의 상이한 질병에 걸린 상태의 융합이 가능하다. 상기 융합은 질병에 따른 특징적인 세포의 이동 또는 세포의 손상을 보여준다. 이동은 다른 (통상적으로 건강한) 조직에서 모니터링될 수 있다. 건강한(healthy)은 질병에 걸리지 않은 상태를 의미한다. 바람직하게는 이중 또는 다중으로 분화된 조직 내에 하이드로겔과 같은 3차원 매트릭스가 여전히 존재한다.
- [0052] 바람직하게는 이식을 위한 비-인간 동물은 조직 거부를 피하기 위해 면역손상된다.
- [0053] 상기 조직은 배쪽 분화된 제1 조직이 비-배쪽 분화된 다른 조직, 예컨대 등쪽 분화된 제2 조직과 융합된 조직으로 구성되거나 또는 (추가적 배쪽 분화 없이) 신경 세포로 분화된 조직이 상기에서 보다 자세하게 설명된 바와 같이 융합된 조직으로 구성된다. 물론, 상기 기재된 모든 바람직한 구현예는 또한 이러한 조직, 특히 상기 영역, 크기 및 검출 표지 또는 발현 표지 등에 관한 것이다. 예를 들어 조직 유형 중 적어도 하나는 이중 또는 다중으로 분화된 조직의 다른 조직 유형에 의해 발현되지 않는 검출가능한 표지, 바람직하게는 형광 표지를 발현한다. 이것은 상기 조직과 다른 조직 유형으로 이동할 수 있는 상기 조직의 세포를 용이하게 검출할 수 있게

한다. 바람직하게는 표지를 갖는 상기 조직 유형은 배쪽 분화된 제1 조직이다.

- [0054] 제공된 조직은 이동하거나 이동된 세포를 가질 수 있다. 상기 세포들은 실질적으로 비-배쪽(예를 들어 등쪽) 다른 조직 유형으로 이동했을 수 있다. 비-배쪽 조직 내에서 배쪽 신경 세포 조직으로부터 이동된 세포는 실질적으로 비-배쪽 조직의 세포 중 5% 이하로 구성될 수 있다(제2 조직 중 비-배쪽 세포량의 백분율). 바람직하게는 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하 또는 1% 이하 또는 배쪽 세포 또는 일반적으로 제1 조직의 세포들이, 비-배쪽 조직 또는 일반적으로 제2 조직 또는 선택적 추가 조직에서 발견된다(제1 조직 세포 당 배쪽이 발견되는 조직의 세포량으로 백분율).
- [0055] 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 바람직하게는 가장 긴 치수로 100 μm 내지 10 mm의 크기 또는 상기 이미 언급된 임의의 크기, 형태 또는 부피를 갖는다. 바람직하게는 250 μm 내지 10 mm 또는 500 μm 내지 5 mm의 크기와 같다.
- [0056] 본 발명의 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 예를 들어 임의의 특정한 형태 또는 종횡비(치수 비율)로 상기에 기재된 바와 같은 구상체 형태로 제공될 수 있다. 이중 또는 다중으로 분화된 조직은 또한 조직 슬라이스로 제공될 수 있다. 이중 또는 다중으로 분화된 조직이 상기 상세히 기재된 바와 같이 성장한 후에 조직 슬라이드가 얻어질 수 있다. 상기 슬라이스는 예를 들어 3 μm 내지 100 μm 또는 5 μm 내지 50 μm 또는 10 μm 내지 30 μm , 바람직하게는 약 20 μm 의 두께를 가질 수 있다. 예를 들어 상기 언급된 바와 같은 가장 긴 다른 치수가 슬라이스에 여전히 표시될 수 있다. 바람직하게는 슬라이싱은 냉동 상태에서 수행된다. 슬라이스는 조직 슬라이스에서 검출 표지 및/또는 발현 표지를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 슬라이스는 현미경 영상화에 사용될 수 있다.
- [0057] 조직은 인공 조직으로 간주된다. “인공(artificial)”은 생체 외에서 성장하여 크기, 일관성, 형태 및 세포 조직과 같은 인공 배양의 확실한 특징을 갖는다는 것을 의미한다. 상기 형태는 불규칙할 수 있고 자연적으로 발생하는 조직과는 다를 수 있고 크기 제한 때문에 세포 조직이 다를 수 있다. 특히, “인공”은 자연적으로 발생하는 조직 및 기관 및 이들의 일부, 예를 들어 자연적인 조직 슬라이스를 제외한다. 3차원 매트릭스가 배양물 중에 여전히 존재할 수 있고/거나 인공 조직은 상기 매트릭스에서 성장함으로써 결정된 형태를 가질 수 있다. 예를 들어 상기 배양물은 특히 상기 기재된 바와 같은 3차원 매트릭스에서 성장함으로써 얻어질 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조직은 오르가노이드, 특히 대뇌 오르가노이드이다.
- [0058] 조직은 상기 언급된 임의의 조직 유형, 예컨대 신경세포 조직, 결합 조직, 간 조직, 췌장 조직, 신장 조직, 골수 조직, 심장 조직, 망막 조직, 장 조직, 폐 조직 및 내피 조직일 수 있고; 임의의 세포, 예를 들어 상기 언급된 줄기 세포를 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명은 인간 피질 중간뉴런 이동을 분석할 수 있는 오르가노이드 융합 분석법을 제공한다. 상기 기술은 대뇌 오르가노이드에 이용 가능한 표현형 분석의 레퍼토리를 향상시키고, 교대로 인간 신경계 질병의 발달 세포 생물학을 연구하는데 사용될 수 있는 표현형의 복잡성을 향상시킨다.
- [0060] 예를 들어 이중 또는 다중으로 분화된 조직의 발달에 영향을 미치는 후보 화합물을 테스트하거나 스크리닝하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명 중 어느 하나의 방법에서의 세포 또는 조직을 후보 화합물과 접촉시키거나 본 발명의 조직을 후보 화합물과 접촉시키고 상기 접촉된 조직의 배양을 유지시키고, 상기 후보 화합물과 접촉하지 않은 상기 조직과 비교하여 조직에서의 임의의 발달적 변화를 관찰하는 것을 포함한다.
- [0061] 상기 접촉시키는 단계는 세포 또는 조직 또는 그것의 전구 조직(제1 조직, 제2 조직 및/또는 임의의 추가 조직과 같은)이 본 발명의 조직으로 발달하도록 처리하는 단계이다. 상기 후보 화합물은 작은 유기 분자, 예컨대 100 Da 내지 5000 Da의 질량을 갖는 분자일 수 있다. 다른 후보 화합물은 생체분자 예컨대 단백질, 핵산 또는 탄수화물일 수 있다. 추가 후보 화합물은 벌크 화합물 예컨대 에탄올과 같은 용매(물론 세포에 일반적으로 적합한 농도로 사용된) 또는 중합체일 수 있다. 상기 처리는 화합물의 특정 효과가 예상될 수 있는 농도여야 한다. 다양한 농도가 동시에 테스트될 수 있다. 통상적으로 후보 화합물의 농도는 1 ng/ml 내지 100 mg/ml, 예를 들어 100 ng/ml 내지 1 mg/ml이다.
- [0062] 특히 바람직하게는, 본 발명의 방법 또는 조직은 후보 화합물로서 약물 후보 중 부작용을 테스트하기 위해 이용될 수 있다. 바람직하게는 선천적인 장애에 대한 원인, 성질 및 가능한 치료가 임의의 변화를 모니터링하여 조사된다. 예를 들어, 잠재적인 원인 물질/환경적 변화/유전자 변형에 의해 접촉될 때 본 발명의 조직의 발달 및/또는 성장을 모니터링함으로써 기형발생 효과를 테스트할 수 있다.
- [0063] 상기 방법으로, 후보 화합물 또는 다른 환경적 영향으로 영향을 받은 발달 효과 또는 장애를 조사할 수 있다.

만일 효과가 초기 분화과정에서만 예측된다면, 예를 들어 세포를 제1 조직 및/또는 제2 조직 또는 선택적으로 추가 조직으로 분화시키거나 성장시킬 때, 세포를 접촉시키는 것으로 충분하다. 효과가 후기 분화 및/또는 세포 배열 또는 분화 후 성장하는 중에 예측된다면(예를 들어 기관 특이적 기형발생 물질), 제1 조직 및/또는 제2 조직 또는 선택적으로 추가 조직을 접촉시키는 것이 충분할 수 있다. 또한 분화 후 또는 중에 조직을 접촉시키는 것이 가능하다. 물론 이것은 세포가 분화하는 중에 접촉시키는 것과 결합될 수 있다. 상기 기형발생 화합물은 예를 들어 에탄올이고, 이는 배아 또는 태아가 발달 중에 에탄올에 노출될 경우 치명적인 알코올 증후군과 같은 치명적인 알코올 장애로 이어진다. 조직 발달, 예를 들어 발달하는 중에 있는 뇌 조직에 대한 에탄올의 효과는 본 발명의 방법으로 조사될 수 있다.

[0064] 바람직한 일 예에 따르면, 본 발명은 발달 조직의 효과를 조사하는 방법으로서, i) 세포에서 관심 유전자의 발현을 감소시키거나 증가시키는 것 또는 ii) 후보 약물을 본 발명의 방법 중에 임의의 단계에 있는 세포에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공하고, 상기 세포는 본 발명에 따른 이중 또는 다중으로 분화된 조직을 향해 배양되고, 바람직하게는 상기 조직 유형 및/또는 융합으로 분화하는 중에 있다.

[0065] 또한 관심 발달 조직 결합을 치료하는데 적합한 후보 치료제를 스크리닝하는 방법으로서, 본 발명의 분화 방법 및/또는 융합 방법을 수행하고 (상기에서와 같이) 본 발명의 방법 중 임의의 단계, 바람직하게는 모든 단계에 있는 상기 세포에 후보 치료제를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0066] 또한 발달적 효과, 특히 선천적인 장애 효과에 대한 후보 약물을 테스트는 하는 방법으로서, 본 발명에 따른 조직 또는 본 발명의 방법 (예를 들어 분화 중, 제1/제2 조직의 발달, 융합 중 또는 융합 후) 중의 조직에 후보 약물을 투여하고, 상기 조직의 관심 세포의 활성을 결정하고, 상기 후보 약물을 투여하지 않은 조직 세포의 활성과 상기 활성을 비교하는 것을 포함하는 방법을 제공하고, 여기서 (대조군에 대한) 상이한 활성은 발달적 효과를 나타낸다.

[0067] 화합물과 물질의 키트가 추가로 제공된다. 상기 키트는 본 발명의 임의의 방법을 수행하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 물론 일부는 표준 화합물이거나 통상적으로 이용가능하기 때문에 모든 물질이 포함될 필요는 없다. 그럼에도 불구하고, 바람직하게는 핵심 물질이 제공된다. 다른 키트에서는 보다 희귀한 물질이 제공된다. 물론 본 발명의 키트 또는 이들 물질은 조합될 수 있다. 키트 내 구성 요소는 통상적으로 별도의 용기, 예컨대 바이알 또는 플라스크로 제공된다. 컨테이너는 함께 포장될 수 있다. 바람직하게는 키트는 본 발명의 방법 또는 이들의 단계를 수행하기 위한 매뉴얼 또는 설명서를 포함한다.

[0068] 본 발명에 따른 조직 배양을 제공하기에 적합한 키트가 제공된다. 상기 키트는 배쪽 분화 유도제 및 등쪽 분화 유도제, 바람직하게는 배쪽 분화 유도제로서 WNT 억제제 및/또는 SHH 증진제 및 바람직하게는 등쪽 분화 유도제로서 SHH 억제제를 포함할 수 있다. 또한 배쪽 또는 등쪽 분화 활성이 없는 신경 성장 인자 또는 분화 인자도 가능하다. 상기 키트는 신경 분화, 예를 들어 대뇌 오르가노이드를 생성하도록 사용될 수 있다. 대안적인 키트에서 상기 언급된 임의의 조직에 대한 성장 또는 분화 인자, 조직 유형 및 기관이 포함될 수 있다.

[0069] 바람직하게는, 상기 키트는 상기 기재된 바와 같은 3차원 매트릭스 또는 상기 3차원 매트릭스를 생성하기 위한 이들 성분을 포함한다. 매트릭스 성분은 예를 들어 수화에 의해 매트릭스로 재구성되는 동결건조 상태와 같은 고정 상태로 제공될 수 있다. 상기 기재된 바와 같은 임의의 매트릭스 또는 이들 성분이 키트 내에 포함될 수 있다. 바람직하게는 매트릭스는 하이드로겔, 특히 상기 기재된 바와 같은 콜라겐 하이드로겔이다. 키트는 상기 재구성 가능한 (바람직하게는 콜라겐) 성분을 포함할 수 있다. 추가의 바람직한 매트릭스 성분은 탄수화물, 특히 중합체 형태(다당류)이다. 바람직한 다당류는 아가로스이다.

[0070] 임의의 키트는 세포 성장 영양소, 바람직하게는 DMEM/F12, 태아 소 혈청, 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 2-메르캅토에탄올 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 실시예에서 언급된 임의의 화합물이 키트 내에 포함될 수 있다.

[0071] 본 명세서에 기재된 임의의 방법 또는 제품은 본 명세서에 기재된 임의의 다른 방법 또는 제품에 대하여 실시될 수 있고 상이한 구현예가 결합될 수 있음이 고려된다.

[0072] 원래 제출된 청구항은 제출된 임의의 청구항의 다중 종속 청구항 또는 제출된 청구항의 조합을 포함하는 것으로 고려된다. 본 명세서에서 논의된 임의의 구현예는 본 발명의 임의의 방법 또는 제품에 대해 시행될 수 있으며 그 역도 고려된다. 특정 조건에 대하여 논의된 임의의 구현예는 상이한 조건에 대해 적용될 수 있거나 시행될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물 및 키트는 본 발명의 방법을 달성하기 위해 이용될 수 있다.

[0073] “포함하는(comprising)”은 개방 종결 용어, 즉 물질의 추가 성분 또는 단계를 허용하는 것으로 이해된다. “

이루어진(consisting of)”은 물질의 임의의 추가 성분 또는 단계가 없는 폐쇄 용어로 이해된다.

- [0074] 본 출원 전체에서 용어 “약(about)”은 어떤 값이 그 값을 결정하기 위해 사용된 장치 또는 방법에 대한 오차의 표준 편차를 포함함을 나타내도록 사용될 수 있고, 설정 값에서 $\pm 10\%$ 를 나타낼 수 있다.
- [0075] 본 발명은 본 발명의 구현예에 제한되지 않고, 하기 도면과 실시예에 의해 추가로 설명된다.
- [0076] 도면:
- [0077] 도 1a 내지 도 1e: 배쪽 약물 처리는 대뇌 오르가노이드를 포함하는 전뇌 배부위를 생성한다. [도 1a] 신경 유도 단계 중 배쪽 약물 패턴을 적용($2.5 \mu\text{m}$ IWP2 및 100 SAG)하는 대뇌 오르가노이드 프로토콜의 개요. [도 1b] qPCR/IHC 분석에 이용된 패턴닝 표지의 발현 영역을 나타내는 인간 관상 뇌 슬라이스의 개략도. [도 1c] 배쪽 대뇌 오르가노이드에서 전뇌 등쪽 정체성 감소 및 전뇌 배부위 정체성 증가를 나타내는 상이한 뇌 영역 표지의 발현에 대한 qPCR 분석. 값은 참조 유전자 TBP에 대한 상대적인 발현 수준($2^{-\Delta Ct}$)으로 그려졌다. 각각의 데이터 지점은 8-10 개의 오르가노이드 집단 풀에 해당한다. 데이터는 평균 \pm SD로 나타내고, 통계적 유의성은 대조군 ($n=6$ 집단) 대 처리군 IWP2+SAG($n=5$ 집단)에 대한 스튜던트 테스트(student's t-test)($df=9$)를 이용하여 테스트되었다. [도 1d - 도 1e] 배쪽 오르가노이드의 전뇌 배부위 정체성(도 1d) 및 대조군 오르가노이드의 전뇌 등 부위 정체성(도 1e)을 나타내는 대조군 및 대뇌 배쪽 오르가노이드의 면역염색 분석의 광시야 영상. 기준자(scale bar)는 $200 \mu\text{m}$ 이다.
- [0078] 도 2a 내지 도 2e: 대뇌 오르가노이드의 융합은 전뇌 배쪽 및 전뇌 등쪽 조직 사이 세포 이동을 허용한다. [도 2a] 대뇌 오르가노이드 융합 공배양 방법의 실험적 개요. [도 2b] 오르가노이드 융합 절차 전반에 걸쳐 상이한 단계에서의 대표적인 광시야 영상. [도 2c] 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합의 면역 염색된 냉동 절편의 타일 스캔 영상은 배쪽(NKX2-1⁺) 및 등쪽(TBR1⁺) 영역의 결합을 나타낸다. [도 2d] 상이한 연령의 오르가노이드로부터 면역 염색된 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합 냉동 절편은 배쪽 조직에서 등쪽 조직으로 이동한 GFP⁺ 세포의 시간 경과를 나타낸다. [도 2e] 등쪽 조직에서 GFP⁺ 세포 밀도를 32($n=3$ 오르가노이드), 46($n=3$), 58($n=4$) 및 80($n=4$) 일령 오르가노이드 섹션에서 정량화하였다. 데이터는 평균 \pm SD로 나타냈고 통계적 유의성은 그룹간 비교를 위해 사후 Tukey 테스트와 함께 일원 분산 분석[F(3,10)=12.59, $p=0.0010$]을 이용하여 테스트하였다. 기준자는 $500 \mu\text{m}$ 이다.
- [0079] 도 3a 내지 도 3c: 대뇌 오르가노이드 융합의 조직 성분의 혼합은 배쪽 영역에서 등쪽 영역으로 가장 강력한 이동을 나타낸다. [도 3a] 배쪽(V), 대조군(C) 또는 등쪽(D) 처리된 조직의 상이한 조합을 포함하는 대뇌 오르가노이드 융합이 생성되었다. 성분들은 GFP(녹색) 또는 tdTomato(빨간색) 중 어느 하나로 표시되었다. 약 80 일령 오르가노이드 융합의 전체 마운트 영상은 배쪽-대조군 및 배쪽-등쪽 오르가노이드 융합 tdTomato⁺ 조직에서 GFP⁺ 스팟(화살표)의 출현을 보여준다. [도 3b] 면역 염색된 혼합 오르가노이드 융합 냉동 절편의 타일 스캔 공초점 영상은 GFP⁻ 오르가노이드 안으로 중간선(점선)을 가로질러 GFP⁺ 세포의 이동을 보여준다. [도 3c] 조직 절단으로부터 GFP⁻ 조직에서 GFP⁺ 세포 밀도의 정량화. 각 데이터 포인트는 개별 오르가노이드에 해당하고 상기 데이터는 평균 \pm SD로 나타내었고 통계적 유의성은 그룹간 비교를 위해 사후 Tukey 테스트와 함께 일원 분산 분석[F(3,19)=8.214, $p=0.0010$]을 이용하여 테스트하였다. 배쪽::대조군($n=7$ 오르가노이드) 및 배쪽::등쪽($n=8$) 융합은 대조군::대조군($n=4$) 및 등쪽::등쪽($n=4$) 융합에 비해 GFP⁺ 세포의 가장 많은 이동을 나타낸다. 기준자는 $500 \mu\text{m}$ 이다.
- [0080] 도 4a 내지 도 4e: GABA 생성 중간뉴런은 융합된 등쪽-배쪽 대뇌 오르가노이드 사이에서 이동한다. [도 4a] 면역 염색된 80 일령 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합 냉동 절편의 전체 오르가노이드 공초점 타일 스캔 영상. GFP⁺ 세포가 GFP⁺ 배쪽 조직에서 GFP⁻ 등쪽 조직으로 융합 중간선(점선)을 가로 질러 이동하는 것이 관찰될 수 있다. GABA 생성 표지 GAD1은 GFP(화살촉)와 유사한 패턴으로 관찰될 수 있다. [도 4b - 4c] 도 4a에서 오르가노이드 융합의 주변부(도 4b) 및 내부 영역(도 4c)의 확대도. GAD1을 발현하는 GFP⁺ 세포가 양쪽 영역(화살표)에서 관찰될 수 있다. [도 4d] 이동된 GFP⁺ 세포(화살표)가 RELN을 발현하지 않음을 보여주는 80 일령 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합 냉동 절편의 등쪽 영역에서 면역 염색한 GFP/RELN의 공초점 영상. [도 4e] 이동하는 GFP⁺ 세포는 미숙한 DCX⁺ 신경세포(노란색 화살표)이고 일부는 성숙한 (DCX⁺/NeuN⁺) 신경세포(파란색 화살표)임을 나타내는

58 일령 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합 냉동 절편의 등쪽 영역에서 면역 염색한 GFP/DCX/NeuN의 공초점 영상. 기준자는 도 4a에서 500 μm 이고, 도 4b 내지 도 4e에서 20 μm 이다.

[0081] 도 5a 내지 도 5h: 배쪽::등쪽 대뇌 오르가노이드 융합에서 이동하는 중간뉴런은 다양한 중간뉴런 하위 유형 표지를 발현한다. [도 5a 내지 도 5h] 80 일령 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합 냉동 절편의 등쪽 영역에서 면역 염색한 공초점 영상. GABA 생성 표지 GAD1 또는 VGAT의 발현이 중간뉴런을 식별하는데 이용되었다. GAD1 또는 VGAT를 발현하는 다양한 이동된 GFP^+ 중간뉴런의 예는 MGE-유래 중간뉴런 표지 SOX6(도 5a) 또는 하위 유형 표지 SOM(도 5b), NPY(도 5c), CB(도 5d) 및 PV(도 5e)를 발현하는 것으로 관찰되었다. 이동된 GFP^+ 중간뉴런은 또한 LGE/CGE-유래 중간뉴런 표지 SP8(도 5f), COUP-TFII(도 5g) 또는 하위 유형 표지 CR(도 5h)을 발현했다. 기준자는 20 μm 이다. 약어: SOM = 소마토스타틴(somatostatin), NPY = 신경펩타이드 Y, CB = 칼빈딘(calbindin), PV = 파브알부민(parvalbumin), CR = 칼레티닌(calretinin), VGAT = 소포성 GABA 수송체, GAD1 = 글루탐산 탈탄산효소 1.

[0082] 도 6a 내지 도 6e: 대뇌 오르가노이드 융합에서 이동하는 세포는 접선으로 이동하는 중간뉴런의 이동 역학을 나타내며 CXCR4 활성화에 민감하다. [도 6a] 이동 역학의 단기간 시간 경과 영상 또는 장기간 약물 처리 중 어느 하나에 대한 오르가노이드 융합 슬라이스 배양 분석의 개략적 표현. 전체 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합 슬라이스의 대표적인 타일 스캔 영상은 녹색으로 표시된 배쪽 GFP^+ 영역 및 표시되지 않거나 빨간색 외곽선의 tdTomato 등쪽 영역으로 나타난다. 도 6b에 나타난 이동하는 세포를 포함하는 영역은 노란색 박스로 표시된다. [도 6b] 이동하는 GFP^+ 세포를 나타내는 3 일 시간 경과 실험의 정지 영상. 세포 몸체가 선행 돌기 중 하나를 따라감에 따라 분지된 선행 돌기는 확장(단힌 화살촉) 분지 및 수축(열린 화살촉) 분지 둘 모두를 나타낸다. [도 6c] 축색 돌기 성장 원뿔로 보이는 다발을 가진 확장 신경돌기(단힌 화살촉)는 시야를 가로 질러 한 방향으로 이동한다. [도 6d] CXCR4 억제제(AMD3100)로 처리되지 않았거나(대조군) 또는 처리된 장기간 배양된 오르가노이드 융합 슬라이스로부터 tdTomato⁺ 등쪽 영역(빨간색 외곽선)으로 이동된 GFP^+ 세포의 광시야 영상. [도 6e] 대조군(n=3 오르가노이드)과 AMD3100(n=3) 처리를 비교하는 스튜던트 테스트(df=4)를 이용한 통계적 유의성 테스트와 평균 \pm SD로 나타난 데이터를 갖는 이동 GFP^+ 세포 밀도의 정량화. 각 데이터 포인트는 개별 오르가노이드로부터 하나의 슬라이스를 나타낸다. AMD3100 처리된 슬라이스 배양에서 보다 적게 이동하는 세포가 관찰되었다. 기준자는 도 6a에서 500 μm , 도 6b - 6c에서 50 μm 이고 도 6d에서 500 μm 이다.

[0083] 실시예

[0084] 실시예 1: 세포 배양

[0085] 오염되지 않고 전분화능 검증을 갖춘, 피더 의존 인간 유도 전분화능 줄기 세포(hiPSC)(Systems Biosciences, cat. no. SC101A-1)를 System Biosciences사로부터 입수하였다. 피더 의존 hiPSC를, 인간 배아 줄기 세포(hESC) 배지[20 ng/mL bFGF(IMBA institute Molecular Biology Service core facility 제조)를 함유하는 DMEM/F12(Invitrogen), 2-메르캅토에탄올, 20% 녀아웃 혈청(Invitrogen), 1% GlutaMAX(Invitrogen), 1% MEM-NEAA(Sigma) 및 3% FBS의 배지 3.5 μl /500mL]를 이용하여 젤라틴 코팅된 6-웰 배양 플레이트(PBS 중 0.1 % 젤라틴)에서 조사된 마우스 배아 섬유모세포(MEF) 배양보조 세포(MTI-GlobalStem, cat. no. 6001G)와 함께 배양하였다. 오염되지 않고 검증된 정상 핵형을 제공하는, 피더가 없는 H9 인간 배아 줄기 세포(hESC)를 WiCell 연구소로부터 입수하였다. 피더가 없는 hESC를 mTeSR1(Stemcell Technologies)을 사용하여 hESC 적합 매트릭셀(Corning cat. no. 354277) 코팅된 6-웰 플레이트에서 배양하였다. 모든 줄기 세포를 5% CO₂ 배양기 내에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 상기 설명된 바와 같이, hPSC를 배양하고 나누는데 표준 절차(Lancaster & Knoblich Nat Protoc 9, 2329-2340 (2014))가 이용되었다. 모든 세포주는 정례적으로 오염에 대해 테스트했고 마이코플라즈마 음성을 확인하였다.

[0086] 실시예 2: 클로닝/분자 생물학/hPSC주 생성

[0087] 세포의 흔한 형광 표시를 위해, 템플릿로서 AAVS1 SA-2A-Puro 공여 벡터를 사용하여 TALEN 기술(Hockemeyer 등 Nat. Biotechnol. 27, 851-857 (2009))로 이전에 수행한 바와 같이 hPSC 내의 세이프 하버 AAVS1 좌위로 리포터 구성을 삽입하였다. 답의 코어 HS4 절연체(2xCHS4)의 측면 배치된 탠덤 반복(flanking tandem repeats)을 포함하는 변형된 백본이 생성되었다. 측면 배치된 절연체 서열 사이에 형광 리포터 발현 카세트를 삽입하였다. 하기 구조물을 iPSC로 삽입하였다: 1) 2xCHS4-EF1 α -eGFP-SV40-2xCHS4, 2) 2xCHS4-EF1 α -tdTomato-SV40-

2xCHS4. 피더가 없는 H9 hESCs에서, 시간 경과 영상 실험을 하는 동안 GFP 발현을 향상시키기 위해 2xCHS4-CAG-eGFP-WPRE-SV40-2xCHS4 구조물을 삽입하였다.

[0088] hPSC를 EB¹¹를 제조하는 것과 동일한 세포 해리 절차를 이용하여 뉴클레오펙션을 위해 단일 세포 현탁액으로 제조하였다. 제조자 지침에 따라 각 TALEN 가이드 1 μ g 및 공여 플라스미드 DNA 3 μ g를 포함하는 뉴클레오펙션 당 800,000 개의 세포를 이용하는 줄기 세포 키트 1과 함께 Amaza nucleofector(Lonza)를 사용하였다. 뉴클레오펙션 후에, 뉴클레오펙션 용액 총 600 μ l 중 200 μ l를 10 cm 세포 배양 접시에 플레이팅하였다. 단일 세포로부터의 콜로니를 4 일 동안 키운 뒤 퓨로마이신(Puro)(Jena Bioscience, cat. no. NU-931-5)으로 처리하였다. 피더 의존 세포에 대해서는, 1.1 μ g/mL puro를 적용하고, 피더가 없는 세포에 대해서는 0.7 μ g/mL이 적용되었다. 퓨로마이신 처리는 생존 콜로니가 수동으로 선택되어 24-웰 플레이트로 옮겨질 수 있을 정도로 충분히 커질 때까지 5-7 일 동안 계속되었다. 24-웰 플레이트에서 콜로니를 나눌 때, 절반의 세포는 유전자형 분석에 사용하고, 나머지 절반은 12-웰 플레이트 및 이후 6-웰 플레이트로 확장하여 추가 실험에 사용하였다. 유전자형 분석을 위해 QuickExtract 용액(EpiCentre)을 사용하여 DNA를 추출하였고, 바르게 표적된 AAVS1 삽입을 확인하기 위해 하기 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다: 1) Puro (AAVS1_Puro-fwd: tcccctcttccgatgttgag (서열 번호 NO: 1) 및 AAVS1_Puro-rev: gttcttgacgtcgggtgac (서열 번호 NO: 2)), 2) eGFP (AAVS1_eGFP-fwd: GAACGGCATCAAGGTGAAGT (서열 번호 NO: 3) 및 AAVS1_eGFP-rev: cttcttgccacgtaacctg (서열 번호 NO: 4)) 및 3) tdTomato (AAVS1_tdTomato-fwd: ctacaaggtgaagatgcgcg (서열 번호 NO: 5)) 및 (AAVS1_tdTomato-rev: tccagcccctctactctag (서열 번호 NO: 6)). 삽입이 이형접합인지 동형접합인지 결정하기 위해, WT 대립유전자의 존재를 하기 추가 PCR 프라이머를 사용하여 테스트하였다: 4) WT (AAVS1_WT-fwd: tcccctcttccgatgttgag (서열 번호 NO: 7) 및 AAVS1_WT-rev: tccagcccctctactctag (서열 번호 NO: 8)). 바르게 표적된 이형접합 또는 동형접합 삽입을 갖는 세포 콜로니를 Cell Banker 2 용액(Ambio, cat. no. 11891)으로 동결시켜 보관하고/거나 추가 실험을 위해 배양하였다.

[0089] 실시예 3: 대뇌 오르가노이드 발생 및 융합

[0090] 문헌[국제 공개 WO 2014/090993, Lancaster 등, Nature 501, 373-379 (2013), Lancaster & Knoblich, Science 345, 1247125-1247125 (2014) 및 Lancaster & Knoblich, Nat Protoc 9, 2329-2340 (2014)]에 기재된 선행 프로토콜을 약간 변형하여 대뇌 오르가노이드를 발생시켰다. 하기 처리 중 하나를 이용한 프로토콜(~5-11 일)의 신경유도 단계 중에 약물 패턴화 처리를 적용하였다: 1) 대조군, 약물 없음, 2) 배쪽, 2.5 μ M IWP2(Sigma, cat. no. I0536) 및 100 nM SAG(Millipore, cat. no. 566660), 3) 등쪽, 5 μ M CycA(Calbiochem, cat. no. 239803). 스톱 약물 용액은 하기와 같이 제조되었다: IWP2(DMSO 중 5 mM), SAG(H₂O 중 1 mM) 및 CycA(DMSO 중 5 mM). 매트릭젤(Corning, cat. no. 356235)에 삽입(embedding)한 후, 분화 배지 25 mL을 포함하는 10 cm 세포 배양 접시에서 오르가노이드를 성장시키고, 첫 번째 배지 교환 후 5-7 일 마다 배지를 교환하며 오르탈 셰이커에서 유지시켰다. 프로토콜 40 일 후, 오르가노이드가 매트릭젤 방울 밖으로 자라기 시작할 때, 상기 분화 배지에 1% 매트릭젤을 보충하였다.

[0091] 오르가노이드 융합을 형성하기 위해, EB를 상기 기재된 바와 같이 대조군, 등쪽 또는 배쪽 프로토콜 중 하나를 이용하여 별도로 성장시키고 개별적으로 패턴화하였다. 매트릭젤 삽입 동안, 2 개의 EB가 동일한 파라필름 웰로 옮겨져 매트릭젤 단일 방울(~30 μ l) 내 삽입되었다. 상기 EB가 고정화된 매트릭젤 방울의 가운데에서 확실히 근처에 가까이 머물도록 20 μ l 피펫 팁을 이용하여 가능한 서로 가깝게 부드럽게 EB를 밀었다.

[0092] 실시예 4: RNA 추출/qPCR

[0093] 각각의 약물 패턴화 처리 그룹에 대해, 8-12 개의 오르가노이드를 2 mL RNA 분해효소가 없는 튜브로 30-40 일에 수집하여 과정 내내 얼음 상에서 냉각시켰다. 상기 오르가노이드를 차가운 PBS로 3회 세척한 후에, 4 °C에서 1 시간 동안 냉각된 세포 회수 용액(Corning, cat. no. 354253)에서 상기 오르가노이드를 인큐베이션하여 매트릭젤을 용해시켰다. 용해된 매트릭젤을 차가운 PBS로 3회 씻어내어 제거하였다. RNA를 RNeasy 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 추출하였다. cDNA 합성은 총 RNA 2 μ g 및 Superscript II(Invitrogen) 효소를 이용하여 제조사 프로토콜에 따라 수행되었다. qPCR 반응은 하기 반응 프로토콜을 이용하여 Biorad 384-웰 기계(CXF384)에서 Sybr Green master mix(Promega)를 사용하여 수행되었다: 1) 95 °C에서 3 min, 2) 95 °C에서 10 s, 3) 62 °C에서 10 s, 4) 72 °C에서 40 s, 5) 2로 가서, 40 사이클, 6) 95 °C에서 1 min, 7) 50 °C에서 10 s. 정량화는 참조 유전자로서 TBP를 이용하여 Δ Ct 값을 계산하여 엑셀에서 수행되었다. 데이터는 TBP와 비교한 발현 수준($2^{-\Delta Ct}$)으로 나타났다.

- [0094] 실시예 5: 대뇌 오르가노이드 슬라이스 배양 및 약물 처리
- [0095] 슬라이스 배양물은 오르가노이드 융합을 바이브라툼 절단으로 형성되었다. 상기 오르가노이드 융합 조직을 4 % 저 융점 아가로스(Biozym, cat. no. 850080)에 삽입하고 200-250 μm 절편을 생성하기 위해 냉각 PBS($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 이 없는)에서 절단했다. 상기 절편을 6-웰 세포 배양 플레이트 중 Millicell 기관형 인서트(Millipore, cat. no. PICM01250) 상으로 옮겼다. 시간 경과 영상화를 위해, 절편을 1-2 일 배양한 후 회전 디스크 공초점 현미경(VisiScope)을 이용하여 영상화하기 위해 마운트했다. 배양 삽입 막으로부터 절편을 잘라내어 유리 바닥 접시에 뒤집었다. 상기 절편 위에 세포 배양 삽입막을 두고 그것을 진공 그리스를 이용하여 접시에 부착시켜 상기 절편을 고정했다. 약물 처리를 위해, 장기간 슬라이스 배양물은 분화 배지(+5% FBS)에서 밤새도록 초기 배양했다. 이어서 상기 배지는 신선한 배지(대조군) 또는 CXCR4 억제제 AMD3100(Sigma, #A5602)을 포함하는 배지로 교환하고 조직 고정 및 추가 면역 형광 과정 전에 3 주간 추가 배양했다.
- [0096] 실시예 6: 조직학/냉동 절편/면역 형광
- [0097] 오르가노이드 조직을 원하는 연령에 수집하고 PBS로 3회 세척하여 4 % PFA 로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새도록 고정했다. 다음 날 상기 조직을 PBS로 3회 세척하고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새도록 PBS 중 30% 수크로오스로 동결 보호하였다. 이어서 상기 조직을 30% 수크로오스/PBS 및 O.C.T. 동결 삽입 배지(Sakura, cat. no. 4583) 1:1 혼합물로 2-4 시간 인큐베이션했다. 다음으로, 2-4 개의 오르가노이드 그룹을 수크로오스/OCT 혼합물에서 크리오몰드로 옮겨 O.C.T.로 채웠다. 삽입된 조직을 드라이 아이드로 냉동시켜 냉동 미세 절단기로 절단하기까지 장기간 보관을 위해 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에 두었다. 냉동된 오르가노이드 조직을 냉동 미세 절단기(Leica)를 이용하여 20 μm 절편으로 자르고 superfrost Ultra Plus 슬라이드 상에 수집하였다. 각 슬라이드가 조직 블록 당 8-10 절편을 포함할 때까지 10 번째 슬라이스 마다 차례로 수집되게 조직 절편을 배열하였다. 상기 절편을 밤새 말리고 나서 면역 형광 표시에 사용하거나 염색 준비가 될 때까지 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.
- [0098] 면역 형광은 슬라이드 상에서 조직 절편에 직접 수행하였다. 상기 O.C.T.는 슬라이드 랙(Sigma, Wash-N-Dry)을 이용하여 PBS에서 10분 세척하여 제거하였다. 상기 절편을 4 % PFA를 이용하여 실온에서 10분 동안 슬라이드 상에서 직접 사후 고정한 뒤, PBS에서 10분씩 3회 세척하였다. 조직 부분을 소수성 PAP 펜을 이용하여 외곽선을 나타냈다. 투과/차단은 0.05 % 아지드화 나트륨과 함께 PBS 중 5 % BSA/0.3 % TX100을 이용하여 수행하고 어두운 가슴 슬라이드 박스 내 실온에서 30분 인큐베이션하였다. 1차 항체(사용된 1차 항체 및 2차 항체의 표가 방법 섹션의 끝에서 찾을 수 있음)를 항체 용액(0.05 % 아지드화 나트륨과 함께 PBS 중 5 % BSA, 0.1 % TX100)에 원하는 희석액으로 첨가하고 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 인큐베이션하였다. 슬라이드를 PBS로 3회 씻어내고 나서 오비탈 셰이커 상에서 실온으로 PBST 내 10 분씩 3회 세척하였다. 2차 항체를 항체 용액 내 1:500으로 첨가하고 실온에서 2 시간 인큐베이션하였다. DAPI 용액(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 5 분 동안 첨가하고 나서 슬라이드를 1차 항체 적용 후에 수행한 바와 같이 세척하고 최종 세척은 PBS를 이용하였다. DAKO 마운팅 배지(Agilent Pathology Solutions, cat. no. S3023)를 이용하여 커버슬립에 마운트하고 밤새 경화시켰다. 이어서, 슬라이드를 영상화할 때까지 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하거나 장기 보관을 위해 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.
- [0099] 장기간 슬라이스 배양을 위해, 세포 배양 인서트 상에서 성장된 슬라이스를 PBS로 씻어낸 뒤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2일 동안 4 % PFA 중에서 고정하였다. 상기 절편을 PBS에서 10 분씩 3회 세척하고 나서 슬라이드 상에서 동결 절단에 대해 수행된 바와 같이 투과/차단 하였다. 1차 항체 및 2차 항체 인큐베이션을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 수행하고 나서, 각 단계 후에 PBS에서 10분씩 3회 세척하였다. 상기 절편을 DAPI(Vector Labs)를 포함하는 Vectashield에 마운트했다.
- [0100] 실시예 7: 영상화/현미경
- [0101] Zeiss Axio Vert.A1 광시야 현미경 및 Zeiss Plan-Neofluar 2.5x 0.085 및 Zeiss LD A-Plan 10x 0.25 Ph1 대물렌즈를 이용한 Axiocam ERc 5s 카메라(Zeiss, Zeiss GmbH)를 사용하여 형광 세포 배양 영상화를 수행했다. tdtomato 및 GFP 채널 모두는 개별적으로 기록되고 이어서 의사 색채화되고 ImageJ의 Fiji package를 이용하여 병합되었다.
- [0102] IHC 염색 및 장기간 슬라이스 배양물의 광시야 영상화는 Sola SM2 광원, (5x 0.15 plan-neofluar, 10x 0.3 plan-neofluar, 20x 0.5 plan-neofluar) 대물렌즈 및 Hamamatsu Orca Flash 4 카메라를 이용하는 Axio Imager Z2(Zeiss, Zeiss GmbH)를 사용하여 수행되었다. 사용된 필터는 Ex360/40nm Em 445/50nm, Ex480/40nm Em 535/50nm 및 Ex560/55nm Em 645/75nm이었다.
- [0103] 공초점 영상화는 20x0.8 plan-apochromat 건조 대물렌즈를 갖춘 Zeiss LSM700 AxioImager를 이용하여 수행되었

다. 405nm(5mW), 488nm(10mW), 555nm(10mW) 및 639nm(5mW)의 레이저와 함께, 파장에 해당하는, 필터 SP490, SP555, SP640 및 LP490, LP560, LP640이 기록에 사용되었다. 전체 오르가노이드 타일 스캔을 위해 XY 스캐닝 단계 및 스티칭 알고리즘이 구현된 Zeiss Zen이 이용되었다. 표지의 공동 국소화를 위해, 20x에서 Z-스캔을 수행하였다.

[0104] 세포 밀도 계산에 이용된 GFP 염색된 슬라이드의 영상화 및 시간 경과 이동은 ex 488 레이저 및 em 필터 525/50을 이용하여 Eclipse Ti-E 현미경(Nikon, Nikon Instruments BV) 상에 마운트되고 Visitron VisiView 소프트웨어로 제어되는 Yokogawa W1 회전 디스크 공초점 현미경(VisiScope, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany)을 사용하여 얻어졌다. sCMOS 카메라 PCO edge 4.2m을 갖춘 10x 0.45 CFI plan Apo lambda(Nikon, Nikon Instruments BV) 대물렌즈를 사용하여 측정이 기록되었다. 세포 계수를 위한 전체 IHC 슬라이스 영상화는 타일 스캔 획득 기능을 이용하여 수행되었다. 이어서 Fiji의 Grid/Collection 스티칭 plugin 51을 이용하여 타일 스캔을 스티칭했다. 시간 경과 이동에 대해, 타일 스캔 Z-스택을 기록하였다. 세포 계수를 위해 수행된 바와 같은 스티칭 후에 최대 Z-투영이 생성되었고, 상기 Z-투영 시간 스택을 세포 이동의 전반적인 시각화를 위해 사용했다. Fiji를 이용하여 잘린 영역이 생성되었고 압축되지 않은 AVI 파일로 저장하였다. 상기 AVI 파일을 Handbrake 소프트웨어를 이용하여 mp4 형식으로 변환하여 보충적인 이동을 생성했다.

[0105] 도면 및 나타낸 영상을 생성하기 위해, “자르기(crop)” 기능 및 Fiji의 “밝기/대비(Brightness/Contrast)” 기능을 이용한 최대/소 수준 변경을 사용하였다.

[0106] 실시예 8: 세포 밀도 정량화

[0107] 대뇌 오르가노이드 융합의 GFP⁻ 표적 영역으로 이동하는 GFP⁺ 세포 수를 Fiji의 “세포 계수(Cell Counter)” 플러그인을 이용하여 수동으로 계산하였다. 오르가노이드 융합 내 상기 GFP⁻ 부분은 ROI 수단으로 외곽선을 표시했고 “측정(measure)” 기능을 이용하여 상기 면적을 계산했다. 상기 세포 계수를 상기 면적으로 나누어 이동된 GFP⁺ 세포의 밀도를 결정했다. 시간 이동 경로(도 2e, 2f) 및 오르가노이드 융합 혼합(도 3b, 3c) 실험에 대해, 조직 냉동 절편의 공초점 타일 스캔 영상이 정량화를 위해 사용되었다. 장기 슬라이스 배양 실험(도 6d, 6e)을 위해, 상기 GFP⁻ 영역을 포함하는 광시야 5x 영상이 계수를 위해 사용되었다.

[0108] 실시예 9: 통계

[0109] 모든 그래프 및 통계 분석은 Prism 7(GraphPad)을 이용하여 생성하였다. 단지 2 그룹을 비교하는 경우(도 1c, 도 6e), 짝을 이루지 않는 양측 스튜던트 테스트를 수행하고, 여러 그룹을 비교하는 나머지 데이터에 대해서는 사후 Tukey 테스트와 함께 일원 분산 분석을 이용했다(도 2f, 도 3c). 샘플들은 통계적 유의성을 테스트하기 전에 정규성에 대해 테스트되었다. 어떤 통계적 방법도 샘플 크기를 미리 결정하기 위해 사용되지 않았다. 실험을 위한 샘플 크기는 유의성을 나타낸 유사 설정의 이전 경험을 바탕으로 추정되었다. 실험은 무작위화되지 않았고 조사자에게 가설이나 조건을 숨기고 실행되지 않았다.

1 차 항체

종	항체	제조사	카탈로그 번호	희석 배율
Rb	FoxG1	Abcam	ab18259	1:200
Rb	TBR1	Abcam	ab31940	1:300
Rb	PV	Swant	PV27	1:1000
Rb	칼빈딘	Swant	CD38a D-28K	1:1000
Ms	칼레티닌	Swant	?	1:1000
Ms	GAD1/GAD67	Millipore	MAB5406	1:800
Rb	VGAT	Synaptic Systems	131 013	1:500
Chk	GFP	Abcam	ab13970	1:1000
Rb	NPY	Abcam	ab30914	1:1000
Ms	레엘린	Millipore	MAB5366	1:200
Rb	SOX6	Abcam	ab30455	1:500
Ms	COUP-TFII	Perseus Proteomics		1:300
Gt	Sp8	Santa Cruz	sc-104661	1:300
Rb	VIP	Immunostar	20077	1:750
Gt	DCX	Santa Cruz	sc-8066	1:200
Ms	NeuN	Millipore	MAB377	1:500
랫	SOM	Millipore	MAB354	1:200
Ms	Nkx2.1	Dako	M3575	1:50
Ms	PAX6	DSHB	PAX6-s	1:200
Rb	DsRed/tdtomato	Clontech	632496	1:250

2 차 항체

호스트	인식	형광 발색단	제조사	카탈로그 번호	희석 배율
당나귀	토끼	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A10042	1:500
당나귀	토끼	Alexa Fluor 647	Invitrogen	A31573	1:500
당나귀	마우스 IgG	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A10036	1:500
당나귀	마우스 IgG	Alexa Fluor 647	Invitrogen	A31571	1:500
당나귀	닭	Alexa Fluor 488	Jackson Immuno	703-605-155	1:500
당나귀	염소	Alexa flour 647	Invitrogen	A21447	1:500
당나귀	랫	Alexa Fluor 647	Jackson Immuno	712-605-150	1:500

qPCR 프라이머

유전자	프라이머 1 서열	프라이머 2 서열
DLX2	ACGTCCCTTACTCCGCCAAG (서열 번호 NO: 9)	AGTAGATGGTGC GGGGTTTCC (서열 번호 NO: 10)
FOXG1	TGGCCCATGTCGCCCTTCCT (서열 번호 NO: 11)	GCCGACGTGGTGCCGTTGTA (서열 번호 NO: 12)
GSX2	CACCGCCACCACCTACAAC (서열 번호 NO: 13)	CAGGAGTTGCGTGCTAGTGA (서열 번호 NO: 14)
LHX6	CCGTCTGCAGGCAAGAACAT (서열 번호 NO: 15)	GACACACGGAGCACTCGAG (서열 번호 NO: 16)
NKX2-1	GCCGTACCAGGACACCATG (서열 번호 NO: 17)	ATGTTCTTGCTCACGTCCCC (서열 번호 NO: 18)
TBP	GGGCACCACTCCACTGTATC (서열 번호 NO: 19)	CGAAGTGCAATGGTCTTAGG (서열 번호 NO: 20)
TBR1	CTCAGTTCATCGCCGTCACC (서열 번호 NO: 21)	AGCCGGTGTAGATCGTGCATA (서열 번호 NO: 22)

[0112]

[0113]

[0114]

실시예 10: 대뇌 오르가노이드 조직의 약물 패턴화에 의한 분화는 전뇌 배쪽의 정체성 생성을 향상시킴

대뇌 오르가노이드 방법(국제 공개 WO 2014/090993, Lancaster 등, Lancaster & Knoblich 둘 다, 상기 모든 것)은 전뇌 등쪽 및 전뇌 배쪽을 비롯한 많은 상이한 뇌 영역을 생성할 수 있다. 그러나 그것은 고유한 패턴화에 의존하기 때문에, 일부 영역의 생성은 가변적이고 특히 더 많은 배쪽(NKX2-1⁺) 중간뉴런 전구 영역의 생성은 빈번하지 않다. 전뇌 배쪽 중간뉴런 전구 영역의 일관성 및 생성을 증가시키기 위해, 배쪽 약물 처리를 포함시켰다(도 1a). WNT-억제 및 향상된 SHH 신호전달의 조합을 이용하여 전뇌 로스트로-배쪽 정체성을 촉진시켰다. 배쪽 오르가노이드의 qPCR 분석은 전뇌 표지 FOXG1의 발현에서의 유의미한 증가를 보여주었다(도 1b, 1c). 전뇌 배쪽 표지 DLX2는 대조군 오르가노이드에 비해 배쪽 오르가노이드에서 극적으로 증가한 반면, 전뇌 등쪽 표지 TBR1은 검출할 수 없게 되었다(도 1b, 1c). 대뇌 오르가노이드 조직의 성공적인 배쪽화를 추가로 확인하기 위해, 상이한 하위 유형의 중간뉴런을 생성하는 전뇌 배쪽 신경절 용기(GE)의 특정 표지의 발현을 조사하였다. GSX2는 등쪽-외측 GE(LGE)에서 발현되고 꼬리쪽 GE(CGGE), NKX2-1은 배쪽-내측 GE(MGE)에서 발현되는 반면, LHX6은 보다 많은 배쪽-유래 MGE(vMGE) 중간뉴런을 생성하는 MGE의 하부 영역에서 발현된다(도 1b). GSX2는 대조군 오르가노이드에서 발현되었으나, 배쪽 오르가노이드에서 또한 증가했다(도 1c). NKX2-1 및 LHX6의 발현은 대조군 오르가노이드에서 검출할 수 없었으나, 배쪽 오르가노이드에서 크게 증가했다(도 1c). 마지막으로, 면역염색으로 대조군 및 배쪽 오르가노이드에서 FOXG1의 광범위한 발현을 나타내는 qPCR 결과가 확인되었으나, 배쪽 오르가노이드만이 전뇌 배쪽 표지 NKX2-1을 발현했다(도 1d). 흥미롭게도, 대조군 오르가노이드는 전구체(PAX6) 및 초기 생성된 신경세포(TBR1) 둘 모두에 대한 전뇌 등쪽 표지를 폭넓게 발현했다(도 1e). 반면에, 배쪽 오르가노이드는 단지 적은 영역의 PAX6⁺ 또는 TBR1⁺를 포함했다(도 1e). 따라서, 상기 결과들은 배쪽 약물 처리 시 등쪽 조직을 희생한 대뇌 배쪽 오르가노이드의 성공적인 생성을 확인시켜 준다.

[0115]

[0116]

실시예 11: 융합된 대뇌 오르가노이드 조직은 연속적인 전뇌 등쪽-배쪽 축 및 장거리 세포 이동을 재현함

단일 조직 내 완벽한 등쪽-배쪽 정체성 축을 재현하기 위해, 오르가노이드 “융합(fusion)” 이라고 명명한, 오르가노이드 조직 공배양 방법을 개발했다. 대조군 오르가노이드는 대부분 전뇌 등쪽 조직을 생성했다(도 1c, 1e). 그러나, 평활화 수용체 억제제 사이클로피딘 A(CycA)로 SHH 활성의 억제는 hPSC로부터 2D 신경세포 분화에서 전뇌 등쪽 정체성을 향상시킬 수 있다. 따라서, 등쪽 정체성을 지지하기 위해, 대뇌 오르가노이드 프로토콜의 신경 유도 단계 중에 CycA로 오르가노이드를 처리하였다(도 2a). 상기 접근에서, 배아체(EB)는 전뇌 등쪽(CycA) 또는 전뇌 배쪽(IWP2+SAG) 오르가노이드 중 하나로 개별적으로 분화되고 패턴화된다(도 2a, 2b). 분화 처리 후, 배쪽 EB 및 등쪽 EB는 단일 매트릭셀 방울 내에 함께 삽입되고(도 2a) 시간이 지나면서 상기 오르가노이드는 함께 성장하여 융합된다(도 2b). 융합된 배쪽::등쪽 오르가노이드의 면역 염색은 한쪽은 배쪽 표지 NKX2-1에 대해 매우 양성인 반면, 반대쪽은 등쪽 표지 TBR1에 대해 양성인 연속적인 조직이 생성됨을 나타냈다(도 2c). 따라서, 상기 오르가노이드 융합 방법은 뇌 발달 중에 발생하는 것과 유사한 배열로 전뇌 등쪽 및 전

뇌 배쪽 영역이 병치되게 할 수 있다.

[0117] 상기 융합된 오르가노이드 사이에서 세포들이 이동할 수 있는지 테스트하기 위해 배쪽/GFP⁺::등쪽 오르가노이드 융합을 생성하기 위해 혼한 GFP 리포터를 포함하는 세포주를 이용했다. 면역 형광 분석은 GFP⁻ 등쪽 오르가노이드 내에서 배쪽 오르가노이드로부터의 많은 GFP⁺ 세포들을 보여주었다(도 2d). 이동하는 세포가 30일 무렵에는 적은 수로 관찰되었다(도 2d, 2e). 세포 밀도는 30일 내지 46일에 극적으로 증가했으나, 46일 내지 80일에는 유의미한 증가가 관찰되지 않았다(도 2e). 상기 오르가노이드는 나이가 들어감에 따라 크기가 증가하므로, 이동된 세포의 절대적인 수는 비슷한 밀도를 유지하기 위해 시간이 지남에 따라 증가해야 한다. 또한, 세포들은 80 일령 오르가노이드에서 등쪽 영역 전체에 보다 분산되어있는 것으로 나타났다(도 2d). 따라서, 상기 결과를 바탕으로, 60 일이 지난 오르가노이드에 대한 향후 분석에 초점을 맞추었다.

[0118] 실시예 12: 이중 분화된 대뇌 오르가노이드 융합의 조직 성분 혼합은 배쪽에서 등쪽으로 지향된 피질 세포 이동을 시사함

[0119] 생체 내 두뇌가 발달하는 동안, GABA 생성 중간뉴런은 이들이 전뇌 등쪽 표적으로 이동하기 전에 전뇌 배쪽 전구 영역에서 시작된다. 융합된 오르가노이드에서 이러한 방향성이 재현되는지 여부를 테스트하기 위해, 개별 조직 성분의 정체성을 다양하게 했다(도 3). 하나의 오르가노이드를 GFP로 표시하고 나머지 다른 오르가노이드는 tdTomato로 계속 라벨링하여 기원::표적(GFP::tdTomato) 배열로 융합을 묘사했다. 상기 패러다임을 이용하여, 대뇌 오르가노이드 융합의 기원 및 표적 영역의 등쪽/배쪽 정체성을 상이하게 통제할 경우 이동하는 세포수를 분석하였다. 배쪽::대조군 및 배쪽::등쪽 융합의 전체 마운트 영상은 tdTomato⁺ 조직내에서 GFP⁺ 스팟 발생을 나타냈다(도 3a). 반대로, 상기 스팟은 대조군::대조군 또는 등쪽::등쪽 융합에서는 거의 관찰되지 않았다(도 3a). 상기 차이는 오르가노이드 융합 조직의 면역 염색된 냉동 절편을 분석했을 때 보다 현저했다. 배쪽::대조군 및 배쪽::등쪽 융합에서 가장 많은 양의 세포 이동이 발생한 반면, 등쪽::등쪽 융합에서 가장 적은 세포 이동이 발생했다(도 3b, 3c). 배쪽::대조군 융합에서 이동한 세포의 평균 밀도가 배쪽::등쪽 융합에서 보다 유의하게 다르지 않았지만, 배쪽::등쪽 융합이 보다 일관되게 많은 양의 이동 세포를 포함했다(도 3c). 상기 데이터는 배쪽에서 등쪽 오르가노이드 조직으로 방향 편향된 이동의 초기 관찰을 확인하고, 융합된 오르가노이드 사이의 상기 이동이 중간뉴런 이동과 유사함을 강하게 시사한다. 마지막으로, 상기 실험은 배쪽::등쪽 융합된 오르가노이드가 오르가노이드 조직 간에 가장 강력한 이동을 생성함을 보여준다.

[0120] 실시예 13: GABA 생성 중간뉴런은 융합된 대뇌 오르가노이드 조직 사이에서 이동함

[0121] 실시예 12가 배쪽::등쪽 오르가노이드 융합에서의 상기 이동이 중간뉴런 이동과 유사함을 시사했기 때문에, 이동하는 GFP⁺ 세포가 GABA 합성을 위한 주요 효소 중의 하나인 GAD1을 발현하는지 여부를 조사하여 상기 이동 세포가 GABA 생성인지 여부를 먼저 테스트했다. 면역 염색은 표적 오르가노이드로 이동한 상기 GFP⁺ 세포가 GAD1을 광범위하게 발현함을 보여주었다(도 4a 내지 4c). 놀랍게도, 전체 오르가노이드를 시각화했을 때, GAD1이 GFP⁺ 이동 세포와 유사한 패턴으로 발현되었다(도 4a). 추가로, GAD1의 발현은 상기 오르가노이드의 가장자리 근처 영역(도 4b) 및 이동 세포의 기원으로부터 보다 멀리 떨어진 영역에서 더 강한 것으로 나타났다. 따라서, 중간뉴런은 오르가노이드 융합 내의 배쪽 영역에서 등쪽 영역으로 이동할 수 있다.

[0122] 발달하는 인간 뇌에서 접선으로 이동하는 세포의 다른 주요 집단은 비-GABA 생성 카잘-레츠니우스(Cajal-Retzius) 세포이다. 상기 세포는 레엘린(RELN) 발현으로 확인된다. 따라서, 오르가노이드 융합에서 이동 GFP⁺ 세포가 또한 RELN을 발현하지는 여부를 테스트했다. 놀랍게도, 오르가노이드 융합의 등쪽 표적 영역에서 실질적인 GFP⁻ 세포, RELN⁺ 세포의 존재에도 불구하고, GFP⁺ 세포에 의한 RELN 발현의 명백한 결여가 관찰되었다(도 4d). 따라서, 상기 데이터는 오르가노이드 융합에서 이동하는 GFP⁺ 세포는 카잘-레츠니우스 세포가 아님을 나타내고, 상기 앞선 결과와 조합하여 이들의 정체성이 GABA 생성 중간뉴런임을 강화한다.

[0123] 마지막으로, 미숙한 이동 신경세포 표지 DCX 및/또는 성숙한 신경세포 표지 NeuN의 발현을 분석하여 상기 이동 세포가 성숙한 신경세포를 생성할 수 있는지 여부를 테스트했다. 상기 GFP⁺ 세포는 DCX를 발현하는 것이 관찰되어(도 4e), 이들의 신경 세포 정체성을 확인했고 하위 세트도 NeuN를 발현하는 것이 또한 관찰되었다(도 4e). 이러한 발견은 상기 이동하는 GFP⁺ 세포가 이동 신경세포(DCX⁺)이고, 또한 상기 이동 신경세포는 성숙한 신경세

포(DCX⁺/NeuN⁺)가 될 수 있음을 나타낸다. 상기 결과로 미루어볼 때, 이러한 결과는 중간뉴런은 융합된 배쪽-등쪽 오르가노이드 사이를 이동할 수 있고 성숙한 신경세포가 될 수 있음을 나타낸다.

[0124] 실시예 14: 이동하는 중간뉴런은 융합된 대뇌 오르가노이드 조직에서 다양한 LGE/CGE 및 MGE-유래 피질 중간뉴런 하위 유형을 생성함

[0125] 이동하는 GFP⁺ 세포가 성숙한 신경세포가 될 수 있고(도 4e), 주로 GABA 생성 중간뉴런인 것으로 보이므로(도 4a, 4b), 다음으로 어떤 중간뉴런 하위 유형이 생성되는지 테스트했다. 중간뉴런은 특히 이중으로 이루어지고 전뇌 배측 내에서 별개의 전구체 서브 집단에 의해 생성되는 다양한 하위유형을 확인하기 위해 다수의 분자 표지가 이용될 수 있다. 인간에서, 대부분의 중간뉴런은 MGE의 NKX2-1⁺ 영역에서 생성된다. 상기 이동하는 GFP⁺ 세포가 MGE-유래 중간뉴런 하위 유형을 생산하는지 여부를 테스트했다. 인간에서, SOX6은 MGE 및 이 영역에서 나오는 미숙 및 성숙한 중간뉴런에서 발현된다. 오르가노이드 융합에서, 상기 GFP⁺ 이동하는 세포들 중 다수의 SOX6⁺ MGE 중간뉴런, 또한 GAD1⁺이기도 한 GFP⁺ 세포가 관찰되었다(도 5a). 따라서, MGE-유래 중간뉴런은 대뇌 오르가노이드 융합 내에서 생성될 수 있다. 상기 발견을 확인하기 위해, MGE-유래 중간뉴런에 대한 발현 표지를 또한 조사하였다. GFP⁺ 이동된 중간뉴런(GAD1⁺ 또는 VGAT⁺)에 의한 소마토스타틴(SOM)(도 5b), 신경펩타이드 Y(NPY)(도 5c), 칼빈딘 D-28k(CB)(도 5d) 및 파브알부민(PV)(도 5e)의 발현이 관찰되었다. 따라서, 오르가노이드 융합 조직에서, 다수의 MGE-유래 중간뉴런 하위 유형이 생성될 수 있다.

[0126] 인간 뇌에서 나머지 중간뉴런은 LGE/CGE로부터 발생한다. MGE에 대해 SOX6과 유사하게, 전사 인자 COUP-TFII/NR2F2 및 SP8은 피질 중간뉴런에 대한 LGE/CGE 운명 추적 표지로 이용될 수 있다. SP8(도 5f) 및 COUP-TFII(도 5g) 둘 모두가 오르가노이드 융합에서 GFP⁺ 이동하는 중간뉴런(GAD1⁺)에 의해 발현되었다. 상기 결과의 확인으로서, LGE/CGE 유래 하위 유형에 대한 발현 표지를 또한 분석했다. 상기 데이터는 이미 GFP⁺ 이동하는 세포에 의한 RELN 발현의 결여를 나타냈고(도 4), 이것은 또한 비-중간뉴런 카잘-레즈니우스 세포외에도 GABA 생성 MGE 및 CGE-유래 중간뉴런의 서브 집단에 의해서도 발현된다. 또한 GFP⁺ 중간뉴런을 발현하는 혈관에 작용하는 어떠한 장 펩타이드(VIP)도 관찰되지 않았다. 그러나, 오르가노이드 융합에서 GFP⁺ 중간뉴런(VGAT⁺)을 발현하는 칼레티닌(CR)이 관찰되었다(도 5h). 종합적으로, 상기 결과는 오르가노이드 융합은 주요 전뇌 배측 하부 영역(MGE 및 LGE/CGE)으로부터 유래된 많은 다양한 중간뉴런 하위 유형을 포함함을 나타낸다.

[0127] 실시예 15: 융합된 대뇌 오르가노이드 조직에서 신경 세포 이동은 대뇌 피질 중간뉴런의 접선 이동과 유사함

[0128] 접선으로 이동하는 피질 중간뉴런의 이동 역학은 시간 경과 영상 실험을 이용하여 광범위하게 문서화되었다. 상기 행동은 방사형 신경교 섬유를 따라 이동하는 방사형으로 이동하는 피질 세포의 행동 또는 LGE-유래 후각 신경구 중간뉴런에서 관찰되는 사슬 이동과 같은 선형으로 이동하는 세포의 행동과 다르다. 오르가노이드 융합에서 이동하는 GFP⁺ 세포의 행동이 피질 중간뉴런의 행동과 유사한지 여부를 결정하기 위해, 배쪽-등쪽 오르가노이드 융합 슬라이스-배양에서 이동하는 GFP⁺ 세포의 시간 경과 기록을 수행했다(도 6a). 오르가노이드 융합의 GFP⁺ 배쪽 기원 영역은 GFP⁻ 등쪽 표적 영역과 쉽게 구별될 수 있다(도 6a). 따라서, 등쪽 오르가노이드 융합 영역으로 이동한 드문드문 라벨된 GFP⁺ 세포의 형태를 쉽게 시각화할 수 있다. 3일에 걸쳐, 고정 세포 및 운동성 세포 둘 모두가 관찰되었고(도 6b), 놀랍게도 장거리로 확장된 축색 돌기와 유사한 동적인 신경세포 돌기가 또한 관찰되었다(도 6c). 놀랍게도, 상기 이동하는 세포는 배아 마우스 피질의 가장자리 영역(MZ) 및 중간 영역(IZ)에서 이동하는 중간뉴런의 역학과 정확히 유사한 역학을 나타냈다. 세포 이동에는 선행 및 후행 돌기가 포함되었다. 선행 돌기는 통상적으로 분지되었고 이동 방향은 분지 역학에 의해 결정되었다. 예를 들어, 다른 방향으로 확장되었던 분지가 수축되는 반면 앞으로 이동하려는 방향으로 분지를 확장시키는 세포의 예가 많이 관찰되었다(도 6b). 또한, 세포는 방향에 있어 빈번하고 갑작스런 변화와 함께 다중 방향으로 이동했고, 이는 피질 내에서 접선으로 이동하는 피질 중간뉴런에 의해 보이는 다중 방향성, 방랑 행동과 유사하다.

[0129] 화학 유인자 SDF-1(CXCL12) 및 이의 수용체 CXCR4는 중간뉴런의 접선이동을 조절한다. 대뇌 오르가노이드 융합에서 관찰된 이동이 CXCR4에 의존적인지 여부를 테스트하기 위해, CXCR4 길항제, AMD3100을 처리한 오르가노이드 융합의 장기간 슬라이스 배양물을 만들었다. 동일한 오르가노이드 융합으로부터 제조된 처리되지 않은 대조군 슬라이스에 비해, GFP⁻ 등쪽 영역으로 이동한 GFP⁺ 세포의 밀도가 AMD3100 처리시 유의미하게 감소했다. 따라

서, 대뇌 오르가노이드 융합에서 세포 이동은 CXCR4 활성화에 의존한다. 상기 데이터와 결합하여, 이러한 결과는 대뇌 오르가노이드에서 관찰된 세포 이동은 접선으로 이동하는 중간뉴런의 이동과 일치함을 확인시켜준다.

[0130]

관찰:

[0131]

배쪽/GFP::등쪽 오르가노이드 융합의 등쪽 영역 내에서 이동하는 GFP^+ 세포가 관찰되었다. 관찰된 세포는 단일 방향으로 이동한다. 선행 돌기는 외견상 서로 독립적인 동적으로 확장 및 수축하는 상이한 분지로 분지된다. 후행 돌기는 세포 몸체가 앞쪽으로 이동함에 따라 따라가고 선행 돌기는 복수 회 후행 돌기가 된다. 세포가 앞쪽으로 이동함에 따라, 선행 돌기가 확장되는 반면 나머지 돌기는 수축한다. 그 다음 세포가 앞쪽으로 진행함에 따라 전체 이동하는 동적 주기가 반복된다.

[0132]

여러 돌기의 동적 확장 및 수축을 포함하는 많은 방향 변화를 나타내는 세포가 관찰되었다. 세포 몸체가 정적 상태를 유지함에 따라, 분지가 복수의 방향으로 확장되고 나서 각 주요 분지가 추가의 고차 분지를 확장한다. 마지막으로, 분지가 특정 방향으로 분지되고, 다른 주요 분지의 수축이 뒤따른다. 이어서 세포 몸체는 확장 분지의 방향으로 이동된다. 세포가 이동할 방향을 결정함에 따라 상기 주기가 반복된다.

[0133]

다수의 이동하는 세포가 관찰되었다. 1) 처음에는 세포가 위쪽으로 이동한다. 새로운 선행 돌기가 아래쪽으로 확장되어 분지됨에 따라 위쪽 돌기는 수축된다. 이어서 세포 이동 방향이 아래쪽으로 바뀐다. 두 갈래로 나뉜 선행 돌기는 동적이어서 한 돌기가 수축됨에 따라 나머지 다른 돌기는 확장된다. 이어서 세포 몸체는 확장된 선행 돌기를 향해 이동한다. 핵동력학 전에, 세포 몸체로부터 선행 돌기의 근위 부위로 이동하는 돌출부가 관찰된다. 이어서 세포 몸체는 돌출부와 평행하게 이동하고 마지막으로 세포 몸체는 돌출부 안으로 이동한다. 2) 제2 세포가 이동하고 방향을 여러 번 바꾼다. 방향을 바꿀 때마다 후행 돌기는 선행 돌기가 된다. 후행 돌기가 수축됨에 따라 이동하려는 방향을 향해 새로운 선행 돌기가 확장된다.

[0134]

상이한 방향으로 확장 및 수축 돌기로 이동하는 다수의 세포가 관찰되었다. 관찰을 시작한지 약 45 시간에 하나의 세포가 일정한 방향으로 빠르게 이동해서 움직이나, 약 70 시간에 선행 돌기가 분지됨에 따라 상기 돌기는 느려진다.

[0135]

다수의 이동하는 세포가 관찰되었다. 관찰을 시작한지 약 6 시간 후에, 세포가 분지된 선행 돌기로 이동한다. 여러 차례 3 분지가 관찰되었다. 세포가 앞쪽으로 진행함에 따라, 분지가 이동 방향으로 확장되는 반면, 다른 분지는 수축된다. 약 23 시간에 상기 세포가 갑작스럽게 방향을 바꾼다. 이것은 새로운 돌기의 확장을 포함하는 반면, 앞선 선행 돌기는 수축된다. 약 39 시간에 상기 선행 돌기가 회전을 시작하고 나서 180도 회전을 한 뒤 확장한다. 이어서 세포 몸체가 상기 선행 돌기를 따라간다.

[0136]

성장 원뿔의 것과 유사한 돌기의 끝에 커진 다발을 갖는 축색 돌기로 보이는 신경 돌기가 관찰되었다. 상기 돌기들은 매우 동적이고 단일 방향으로 확장하나 갑작스런 방향 변화도 나타낸다.

[0137]

실시예 16: 세포 이동 분석법

[0138]

융합된 대뇌 오르가노이드를 이용한 세포 이동 분석법을 개발하였다. 배쪽-등쪽 오르가노이드 융합은 전뇌 배쪽 유래 피질 억제 중간뉴런의 것과 유사한 강력한 장거리 세포 이동을 나타낸다. 대뇌 오르가노이드 융합에서 전뇌 영역의 배쪽에서 등쪽으로 실질적으로 보다 많은 이동이 관찰되었다. 오르가노이드 융합 내에서 이동하는 세포는 GABA 생성 표지(GAD1/VGAT)를 발현한다. 상기 이동된 GFP^+ 세포는 다양한 중간뉴런 하위 유형을 생산할 수 있다. 또한, 이동하는 GFP^+ 세포에 의한 RELN 발현의 기여는 전뇌 배쪽 유래 중간뉴런 정체성을 지지한다. 융합된 오르가노이드에서 GFP^+ 세포의 이동 역학은 피질 내에서 접선으로 이동하는 중간뉴런에 의해 보이는 특징적인 이동 행동과 유사하다. 마지막으로, 오르가노이드 융합에서 상기 세포 이동은 발달 중인 마우스 피질에서 접선으로 이동하는 중간뉴런에 대해 관찰된 바와 같이 CXCR4 억제로 억제되었다. 요약하면, 전뇌 영역에서 배쪽으로부터 등쪽으로 인간 피질 중간뉴런의 이동을 재현했다. 또한, 상기 세포가 미숙 및 성숙한 신경 세포 표지 둘 다를 보인다는 관찰은 이들이 전뇌 피질 등쪽 표적 영역에 도달하자마자 성숙을 경험하는 능력을 나타낸다. 이것은 선행 단일 오르가노이드 방법 내에서 달성이 가능했던 것보다 향상된 세포 다양성 기술을 포함하는 발달 중인 인간 피질 회로를 재현할 흥미진진한 기회를 나타낸다.

[0139]

상기 기술의 흥미진진한 적용 분야는 인간 발달 생물학 및 신경계 질환과의 관계를 연구하는 것이다. 상기를 염두에 두고 상기 분석을 특징지으면서, 상이한 실험 패러다임이 제시되었고, 이들 각각은 신경 세포 이동과 관련된 다양한 측면 및 과학적 질문을 조사하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 융합된 오르가노이드 중의 하나 안에

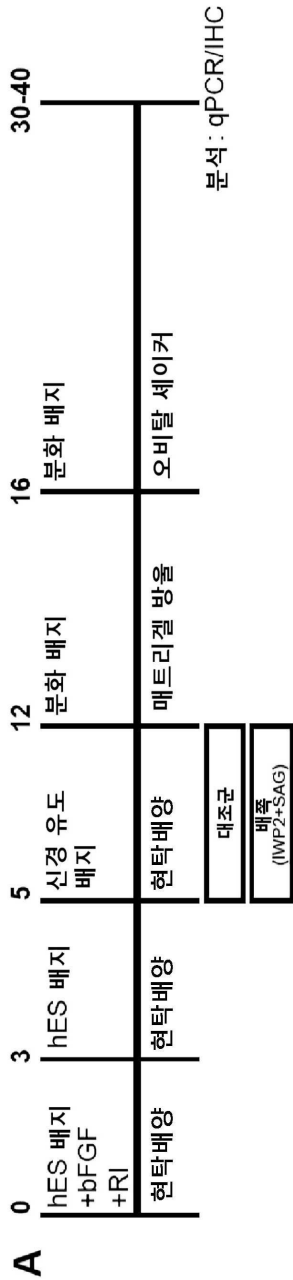
있는 세포를 형광 리포터로 라벨링하면 신경세포의 장거리 이동을 시각화할 수 있다. 이것은 온전한 오르가노이드 융합의 전조적 표본 영상화를 통해 시간이 지남에 따라 연속적으로 모니터링될 수 조차 있다. 또한, 신경 세포의 하위 유형 확인을 위해 면역 염색을 이용하여 세포의 정체성을 쉽게 검사할 수 있다. 많은 정신 질환, 예컨대 조현병은 특정 중간뉴런 하위 집단에서 선택적 결손을 포함한다고 여겨지기 때문에 이것은 유용하다(Lewis Current Opinion in Neurobiology 26, 22-26 (2014)). 제2 유형의 분석은 신경 세포 이동에 대한 특정 분자의 역할을 해부하여 이들이 세포 자율적 방식 또는 세포 비-자율적 방식으로 작용하는지를 결정하는 것이다. 예를 들어, 본 발명의 이중 분화된 조직을 이용하여, 관심 유전자의 돌연변이 또는 야생형 대립 유전자 중 하나를 포함하는 별개의 세포주로부터 기원 및 표적 오르가노이드를 유래시켜 독립적으로 이동 기원 또는 표적 중 하나의 오르가노이드를 유전적으로 조작할 수 있다.

[0140] 공초점 시간 경과 영상이 신경 세포 이동의 단기 역학을 분석하는데 사용될 수 있는 오르가노이드 융합 슬라이스 배양 패러다임이 또한 제시된다. 예컨대 GABA 같은 일부 분자는 이동하는 중간뉴런의 운동성에 영향을 미치고, 이것은 장기 이동 분석에서 미묘한 표현형을 생성할 수 있고, 따라서 대신에 이동 세포 역학의 보다 높은 시간 분해능 분석을 요구하기 때문에 이것은 중요한 도구이다. 또한, 장기간 슬라이스 배양은 상이한 약물 처리가 세포 이동에 영향을 미칠 수 있는 방법을 테스트하는데 이용될 수 있다. 이것은 세포 이동에 대한 많은 상이한 분자의 효과를 결정하기 위한 약물 스크린을 허용한다.

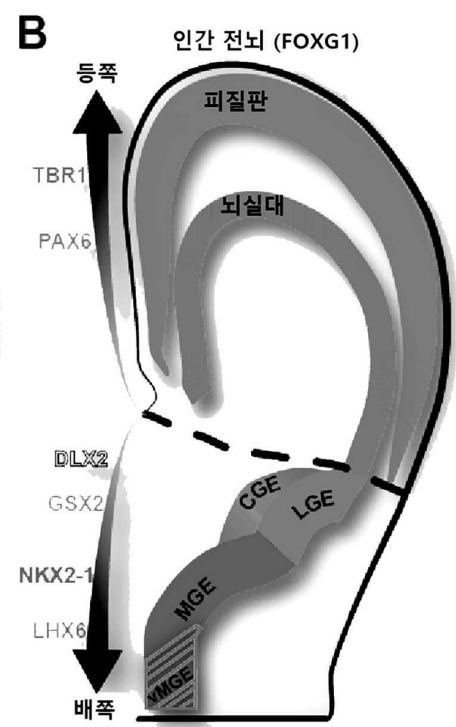
[0141] 마지막으로, 상기 융합된 오르가노이드 조직은 세포 이동을 넘어서 독특한 적용 분야를 또한 제시한다. 추가 일 실시예로서, 축색 돌기 추정 모습을 갖는 실질적인 신경돌기 역학이 관찰되었다. 또한, 전뇌의 배쪽-등쪽 융합에 특히 초점을 맞추었지만, 상기 오르가노이드 융합 패러다임은 함께 성장시킬 수 있는 뇌 영역 정체성의 유연성을 허용한다. 추가의 뇌 영역 특이적 오르가노이드 프로토콜(Jo 등 Stem Cell 19, 248-257 (2016); Hockemeyer 등 Nat. Biotechnol. 27, 851-857 (2009); Preibisch 등 Bioinformatics 25, 1463-1465 (2009))과 함께, 오르가노이드 융합을 이용하여 모델링될 수 있는 가능한 뇌 회로는 방대하다. 따라서, 오르가노이드 융합 기술은 대뇌 오르가노이드에서 가능한 표현형 분석을 크게 향상시키고, 상기 방법의 유연성은 인간 신경계 질환의 생체 외 모델의 장래 발달을 엄청나게 확장시킨다.

도면

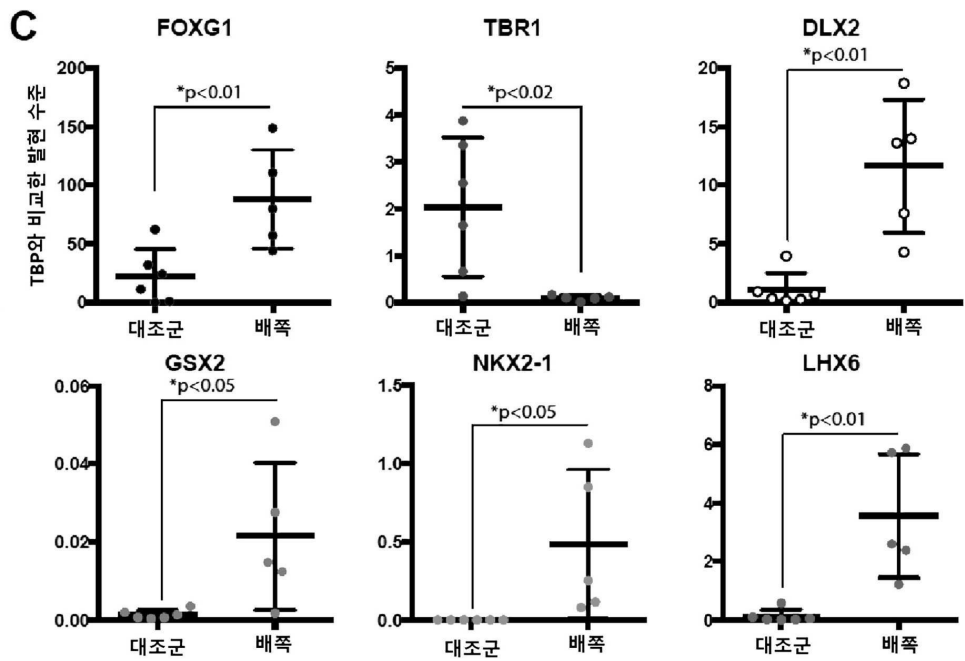
도면1a



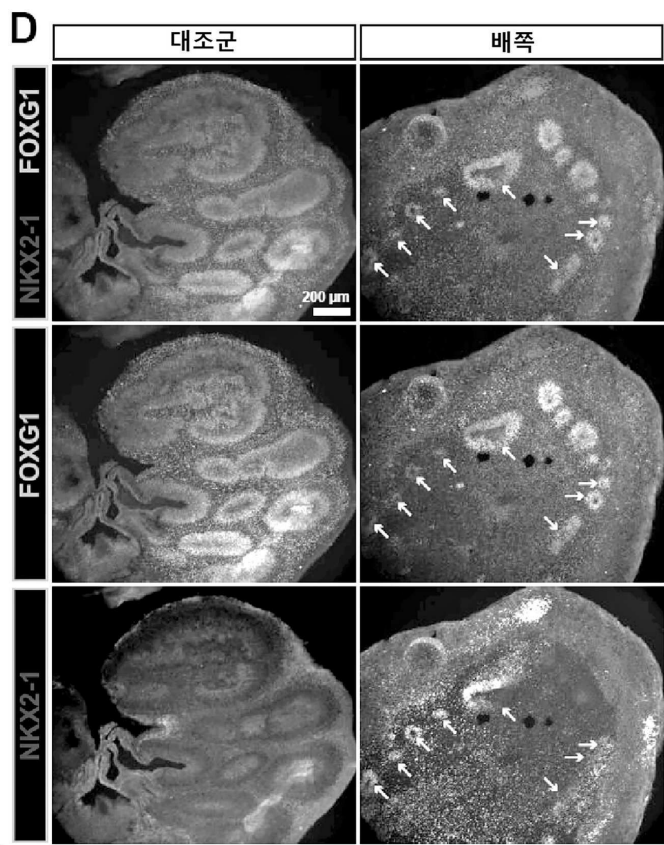
도면1b



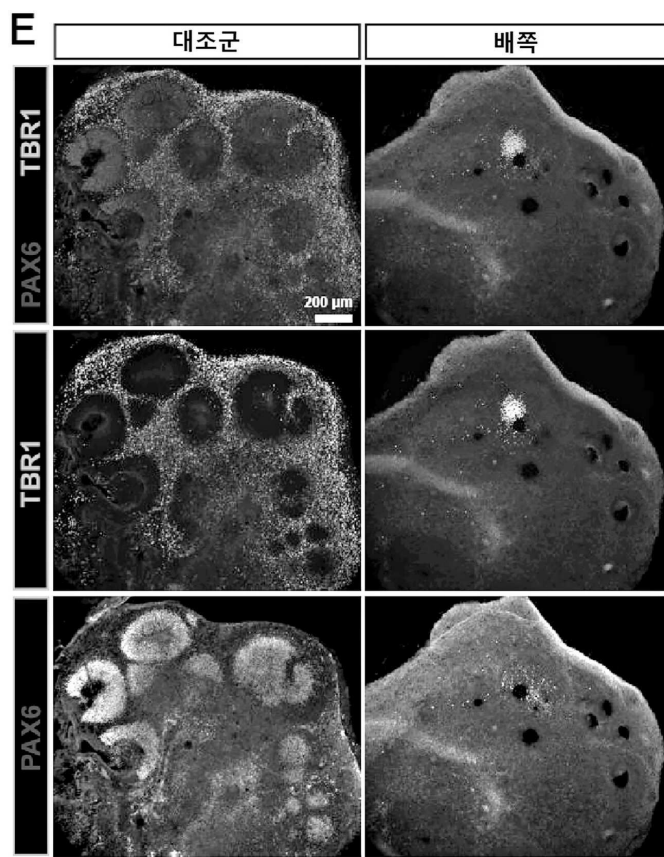
도면1c



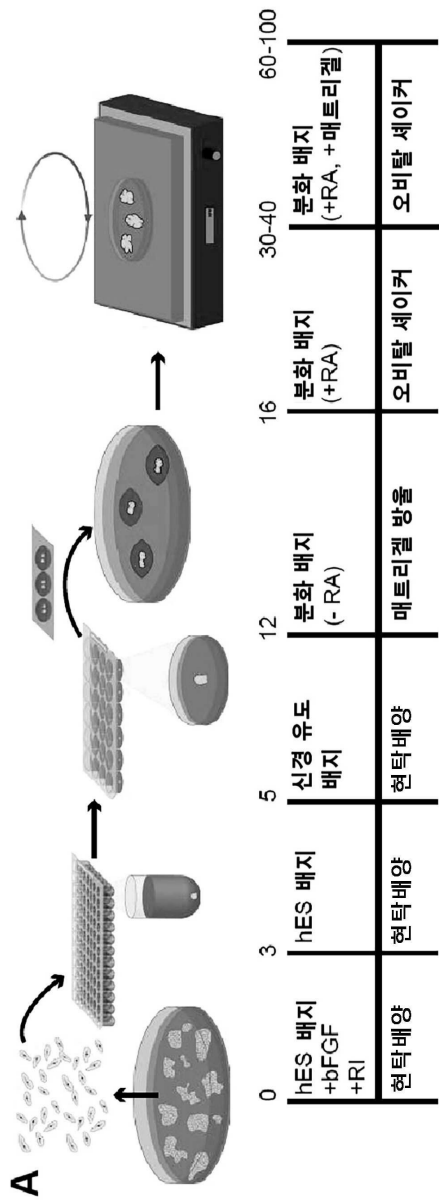
도면1d



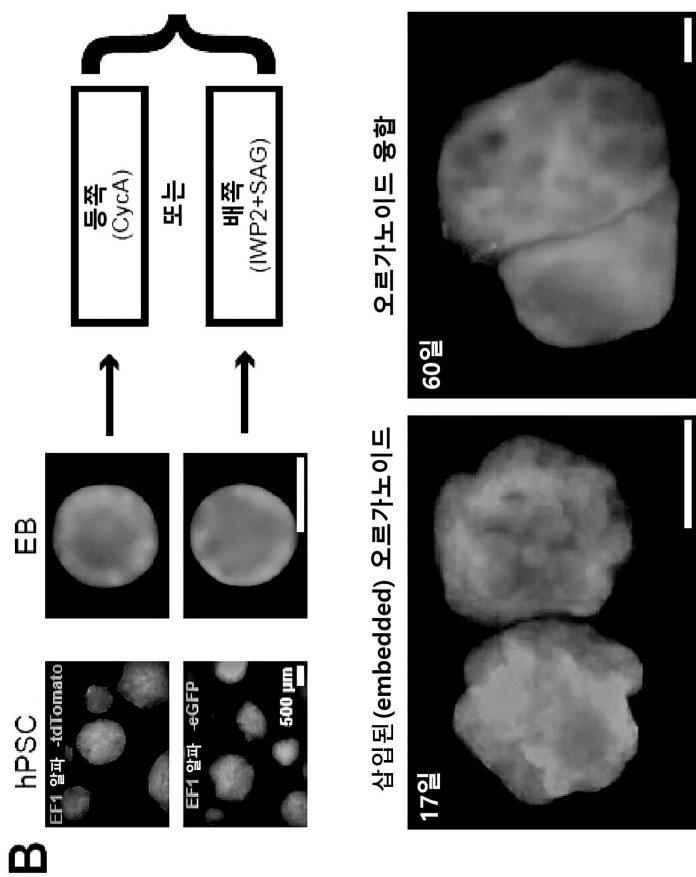
도면1e



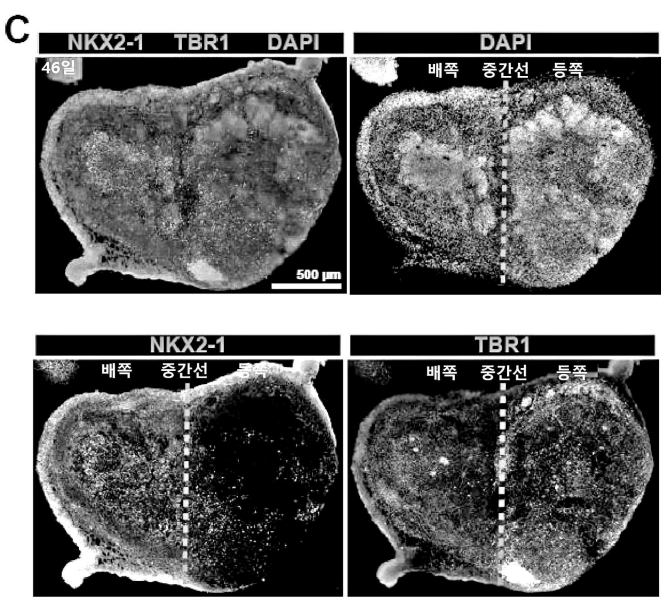
도면2a



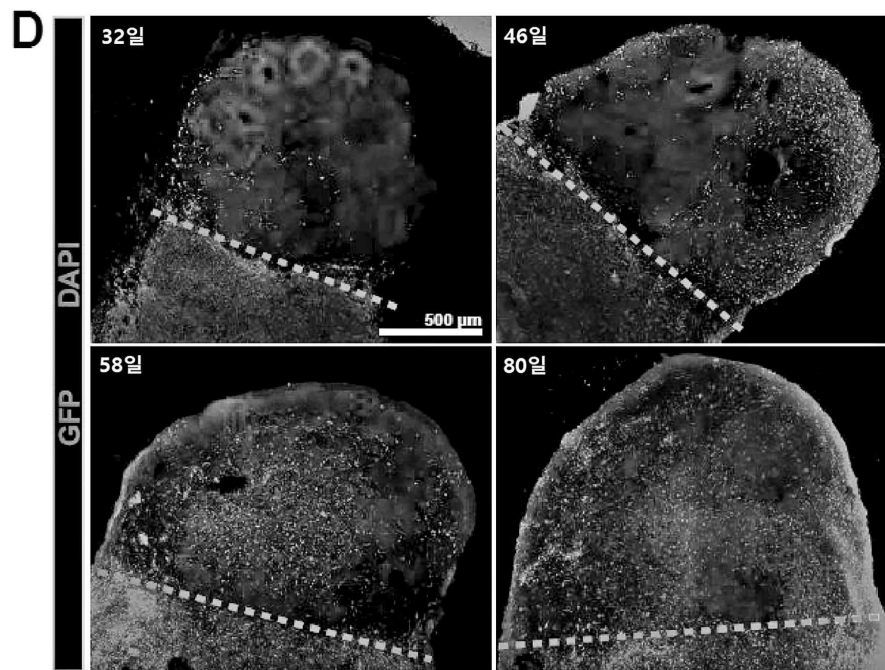
도면2b



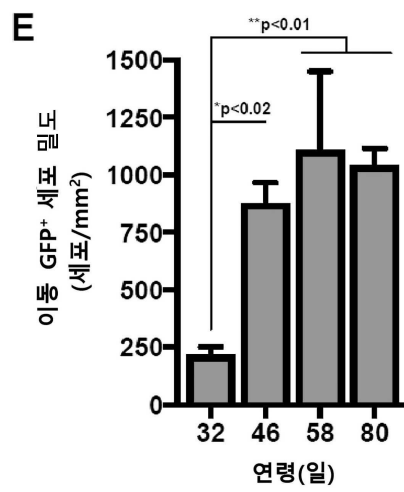
도면2c



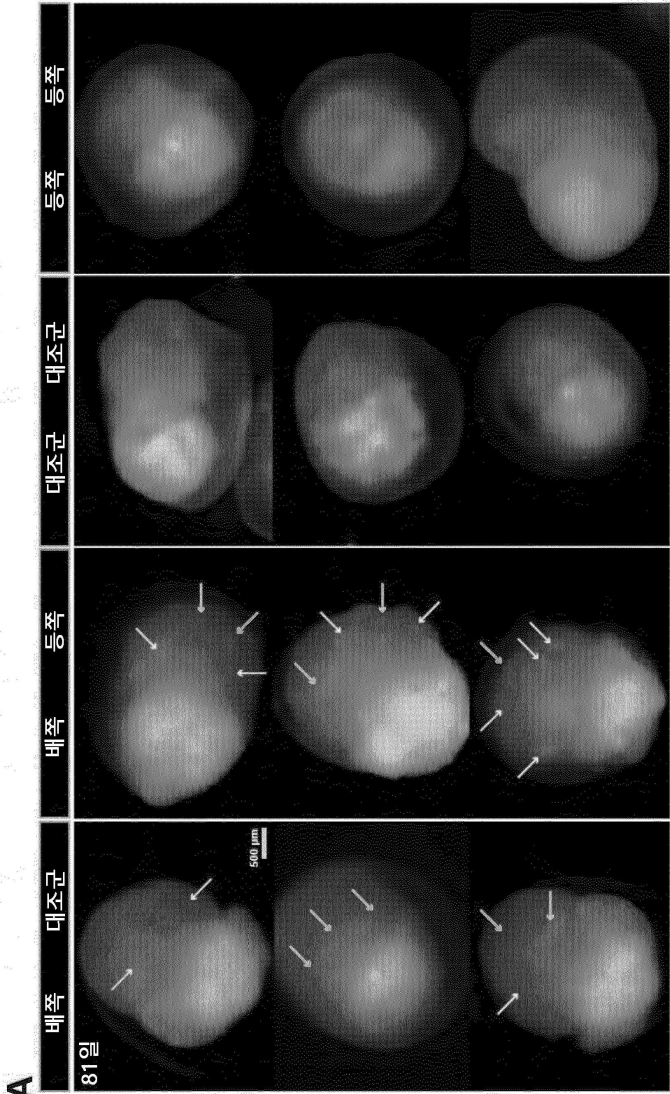
도면2d



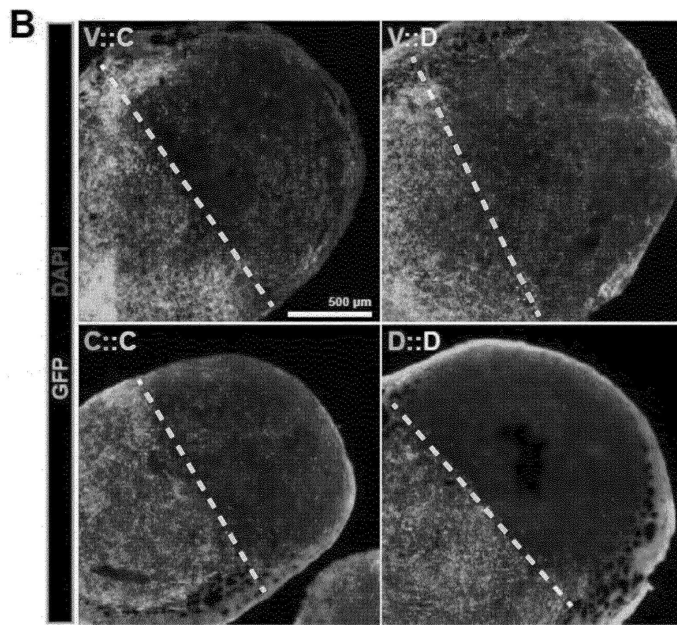
도면2e



도면3a

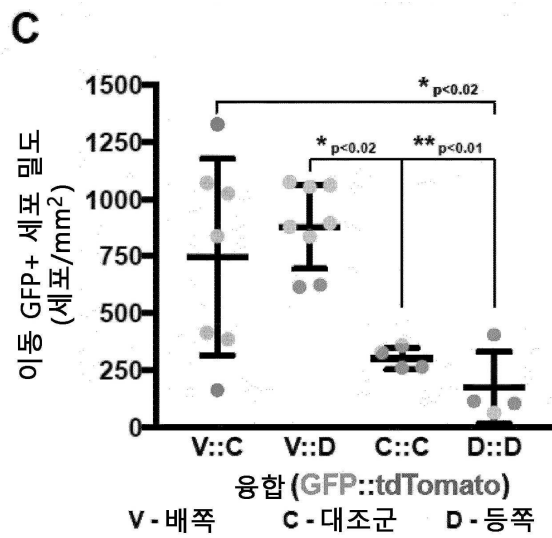


도면3b

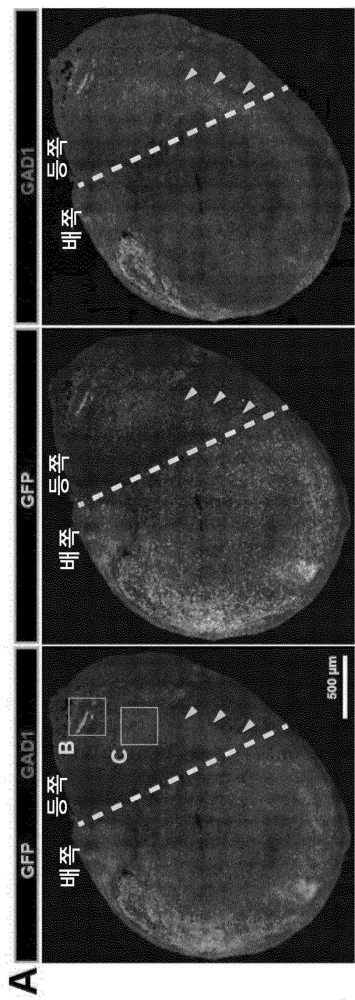


80일령 오르가노이드

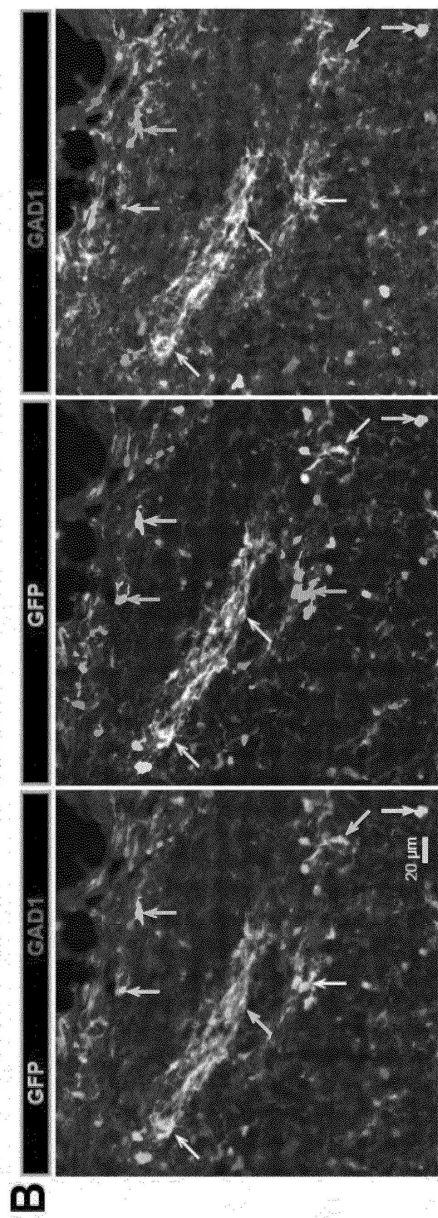
도면3c



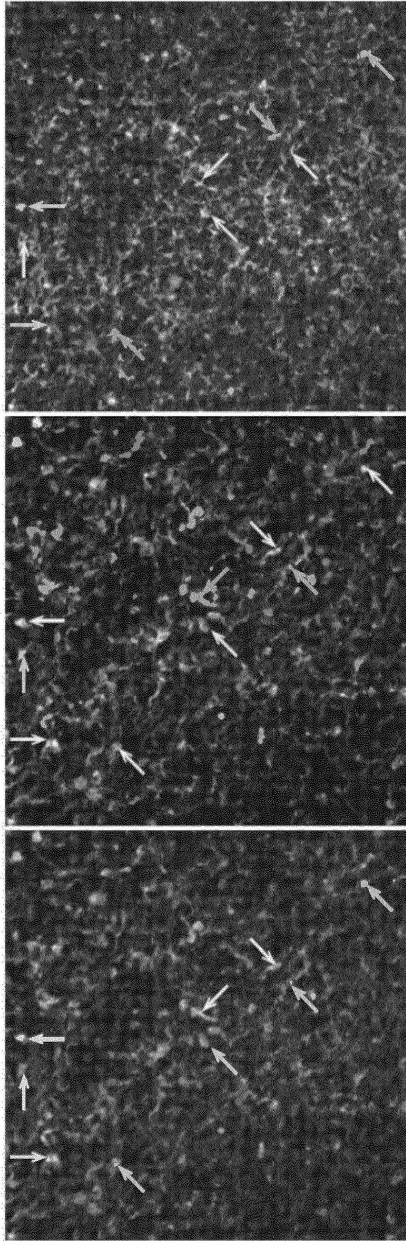
도면4a



도면4b

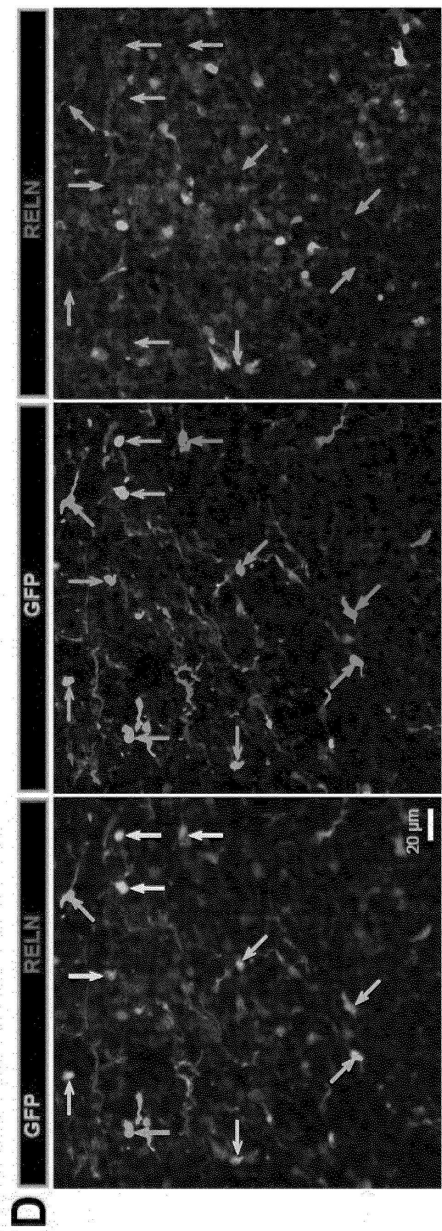


도면4c

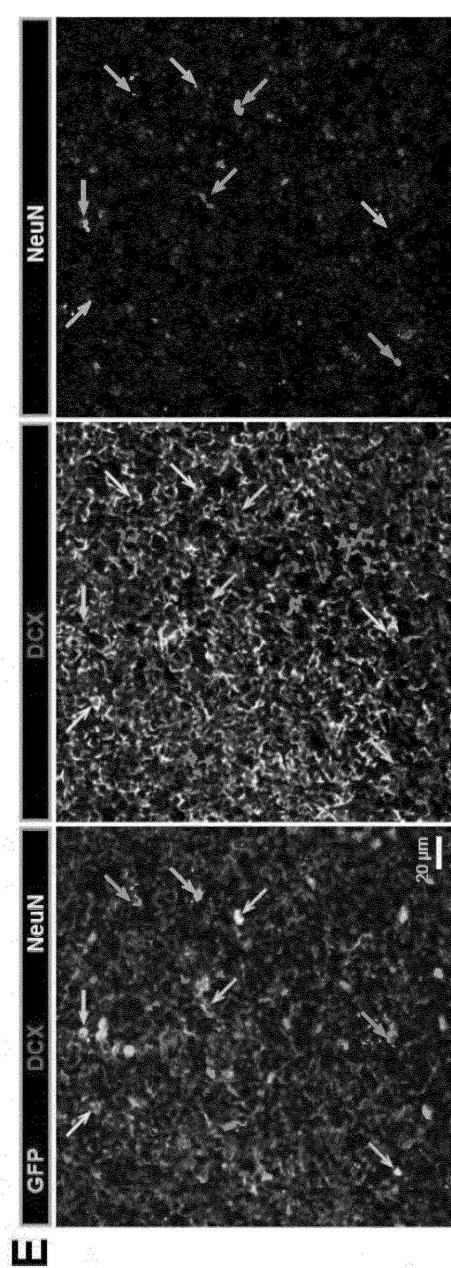


C

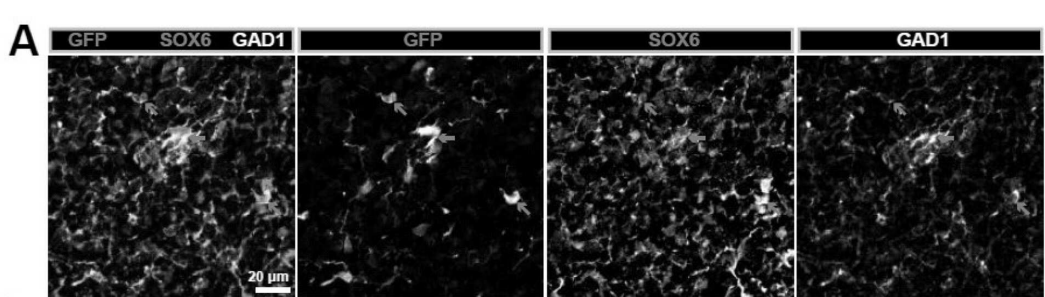
도면4d



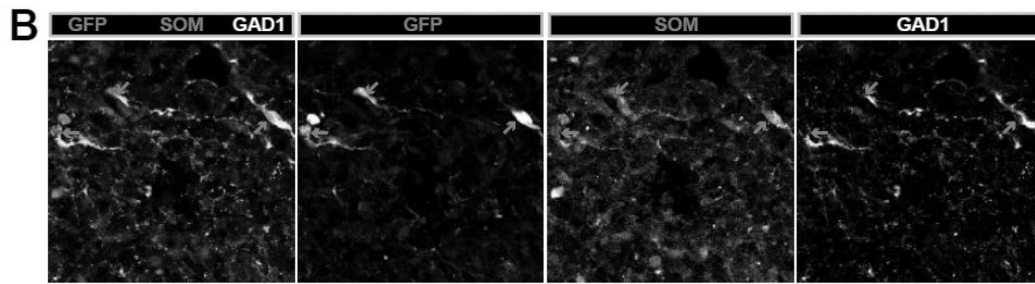
도면4e



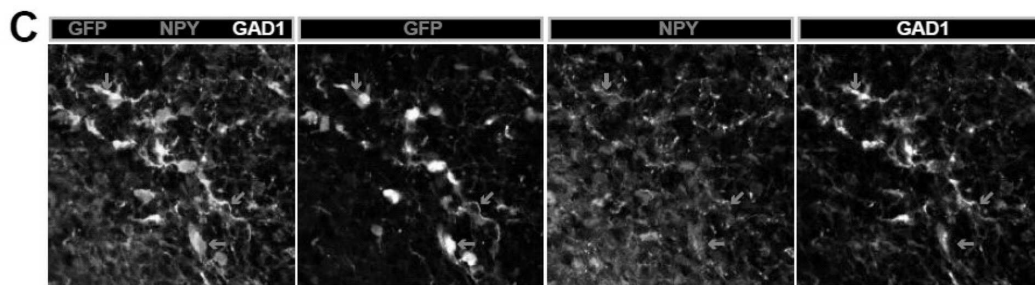
도면5a



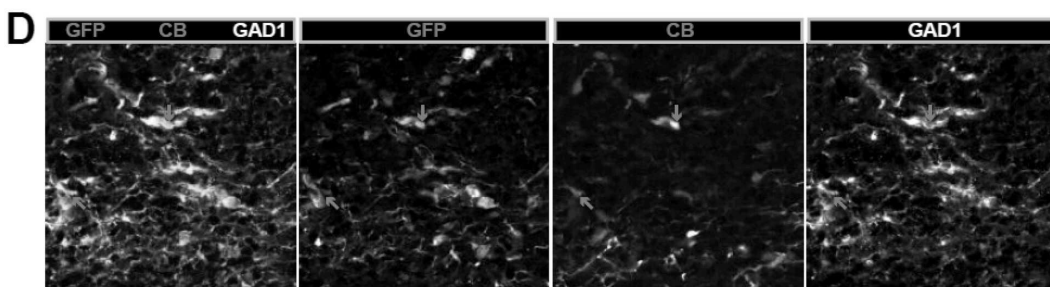
도면5b



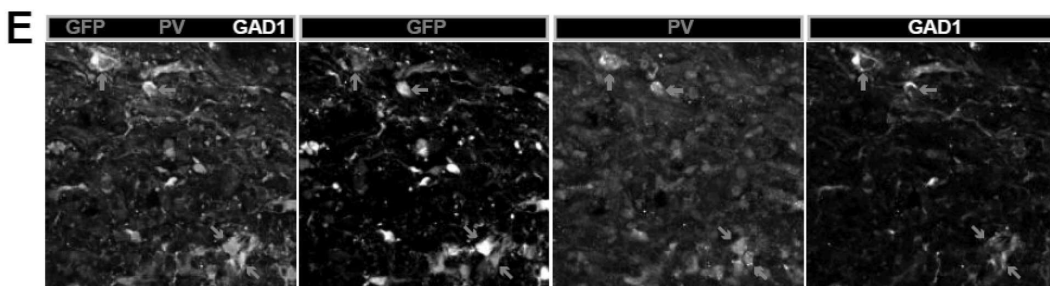
도면5c



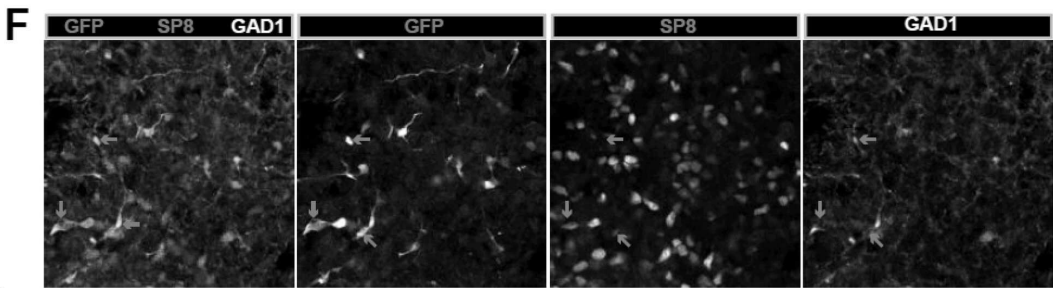
도면5d



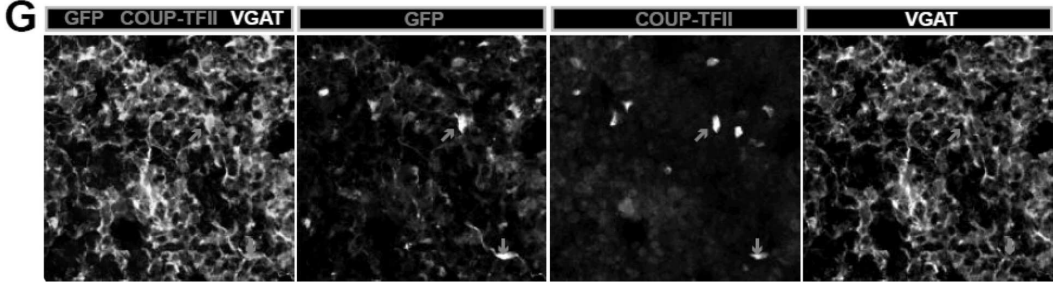
도면5e



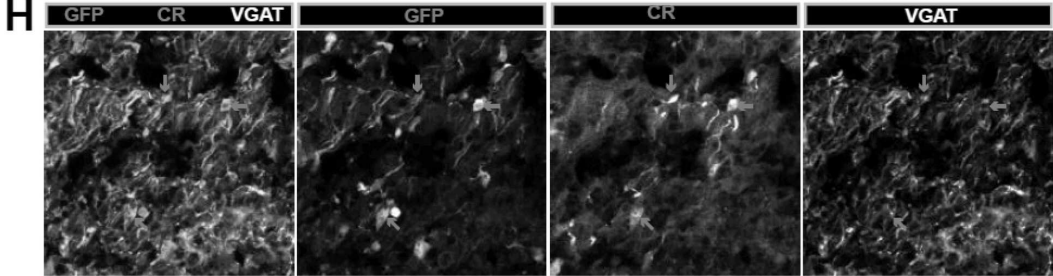
도면5f



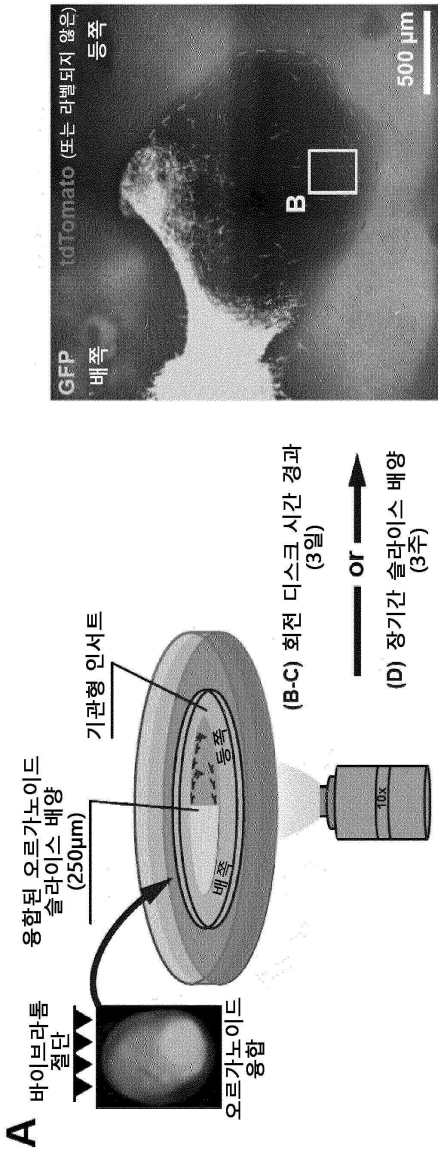
도면5g



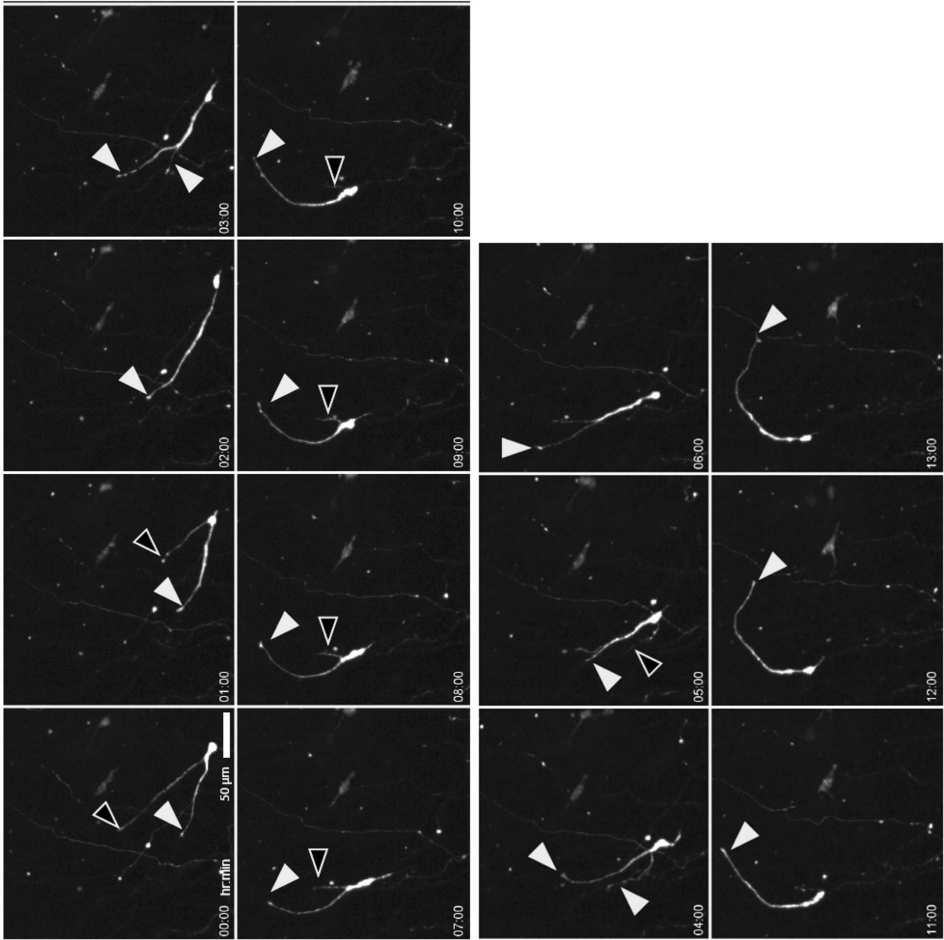
도면5h



도면6a

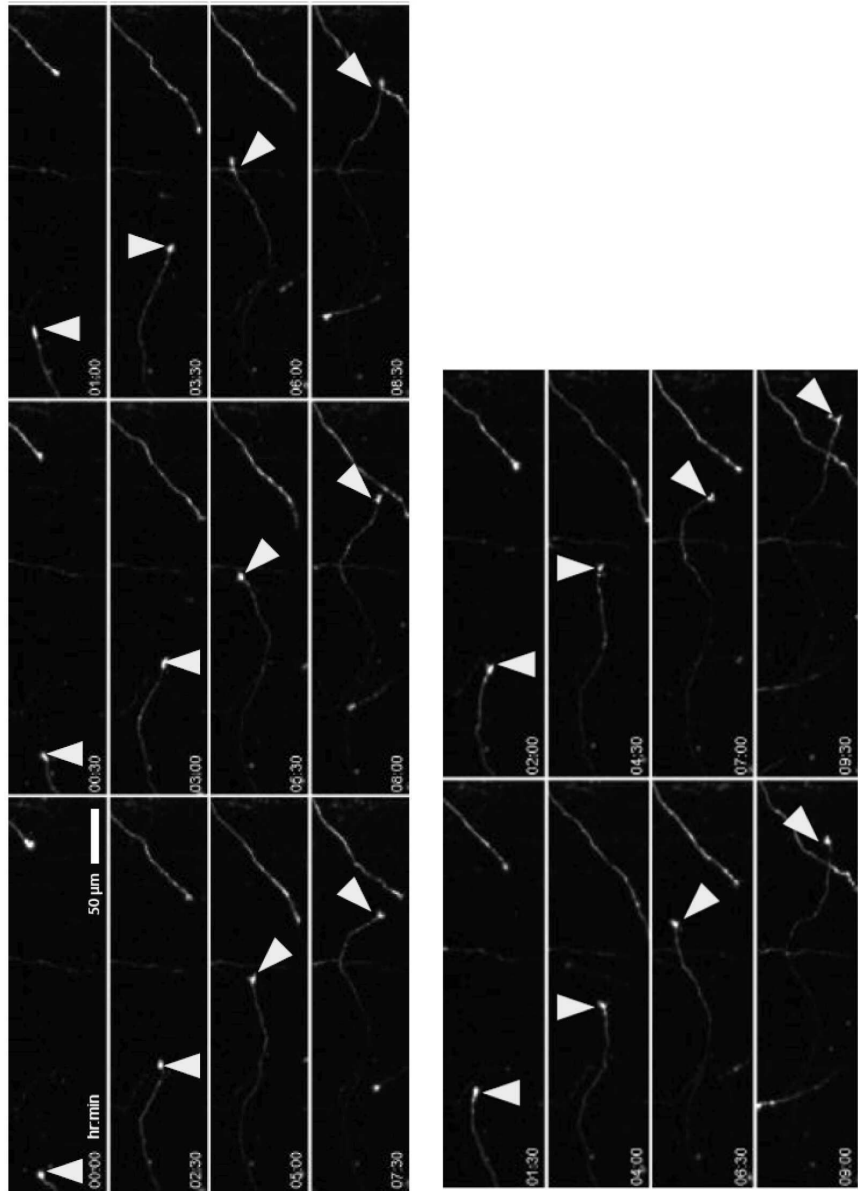


도면6b



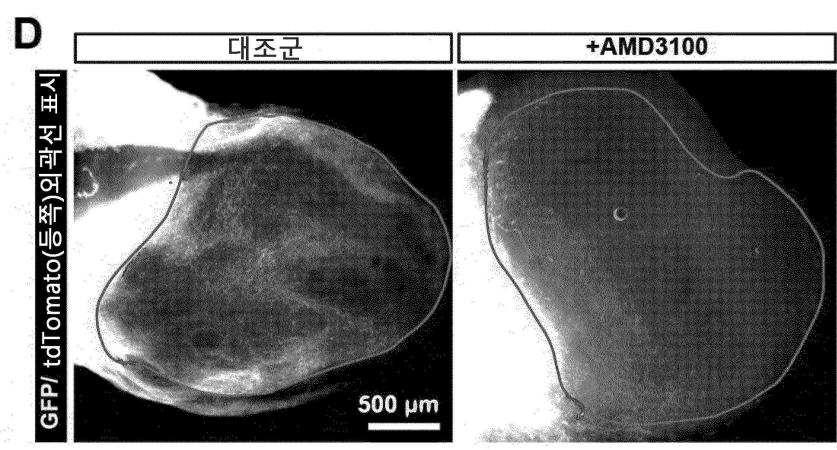
B

도면6c

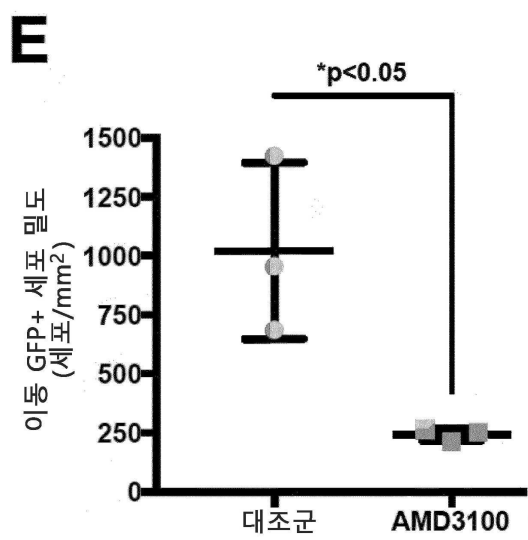


C

도면6d



도면6e



서열 목록

- <110> IMBA - INSTITUT F MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE GMBH
- <120> Bi- or multi-developed organoid
- <130> r72602
- <150> EP 17168051.5
- <151> 2017-04-25
- <160> 22
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer

<400>	1	
tccccctcttc	cgatgttgag	20
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
gttcttgcag	ctcggtgac	19
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
gaacggcatc	aagtggaact	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
cttcttggcc	acgtaacctg	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
ctacaaggtg	aagatgcgcg	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 tccagcccct cctactctag 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 tcccctcttc cgatgttgag 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 tccagcccct cctactctag 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 acgtccctta ctccccaag 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 agtagatggt gcggggtttc c 21
 <210> 11
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 tggcccatgt cgcccttcct 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 gccgacgtgg tgccgttgta 20

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 caccgccacc acctacaac 19

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 caggagttgc gtgctagtga 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 ccgtctgcag gcaagaacat 20

<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	
	gacacacgga gcactcgag	19
<210>	17	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	17	
	gccgtaccag gacaccatg	19
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	18	
	atgttcttgc tcacgtcccc	20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	19	
	gggcaccact ccactgtatc	20
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	20	

cgaagtgcaa tggctcttag g 21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

ctcagttcat cgccgtcacc 20

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

agccggtgta gatcgtgtca ta 22